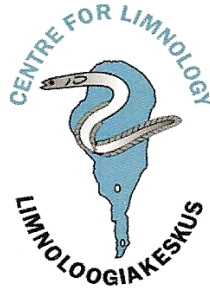




EESTI MAAÜLIKOOL  
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut



**Carmen Kivistik**

**TOKSILISED SINIVETIKAD EESTI SUURJÄRVEDES**  
**TOXIC CYANOBACTERIA IN ESTONIAN LARGE LAKES**

Magistritöö

Vee ja maismaa ökosüsteemide rakendusbioloogia eriala

Juhendaja: Kristel Panksep, *MSc.*

Tartu 2018

Eesti Maaülikool		Magistritöö	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		lühikokkuvõte	
Autor: Carmen Kivistik		Õppekava: Vee ja maismaa ökosüsteemide rakendusbioloogia	
Pealkiri: Toksilised sinivetikad Eesti suurjärvedes			
Lehekülgi: 66	Jooniseid: 28	Tabeleid:8	Lisasid: 2
Osakond: Hüdrobioloogia ja kalanduse õppetool			
Uurimisvaldkond: Bio- ja keskkonnateadused; B260			
Juhendaja: Kristel Panksep, MSc.			
Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 2018			
<p>Kliima soojenemise ja jätkuva eutrofeerumise tagajärjel on tsüanobakterite ehk sinivetikate poolt põhjustatud veeõitsengud sagenenud. Õitsengut põhjustavate liikide seas võivad esineda toksilised tüved. Tsüanotoksiine sisaldava vee allaneelamine võib põhjustada tõsiseid terviseprobleeme, seetõttu on oluline anda hinnanguid suplus- ja joogivee ohutusele. Traditsiooniliselt hinnatakse veeõitsengute toksilisust vetikate biomassi ja liigilise koosseisu alusel. Kuna toksilised ja mittetoksilised tüved on morfoloogiliselt identsed, ei ole mikroskoobi abil neid võimalik teineteisest eristada.</p> <p>Töö eesmärgiks on peamiste mikrotsüstiine ja anatoksiine tootvate sinivetikate tuvastamine ja arvukuse hindamine molekulaarsete meetoditega Peipsi järve ja Võrtsjärve 2011–2016 aastate vegetatsiooniperioodil (mai-oktoober) kogutud proovidest. Toksiliste genotüüpide ja arvukuse hindamiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni meetodit (PCR) ja reaalaaja kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni meetodit (qPCR).</p> <p>Töös uuritud toksiine tootvatest perekondadest <i>Microcystis</i>, <i>Dolichospermum</i> ning <i>Planktothrix</i> on olulisim toksiliste genotüüpide koguarvu moodustumisel perekond <i>Microcystis</i>, moodustades &gt; 90% toksiinigeenide koguarvukusest. Töös uuritud aastate vältel täheldati märkimisväärsed väärtusi mikrotsüstiini kodeeriva <i>Mcy</i> geenikoopiate arvukuses, mis küündis kohati lausa üle 1000 000 koopiani proovi kohta. Sellest tulenevalt võib eeldada, et tsüanotoksiinid on ohuks ka Peipsi järves, eriti õitsengumassi akumulatsioonil ranna-aladele.</p> <p>Suurt rolli toksiliste genotüüpide esinemisel mängivad ilmastikutingimused, toksiliste genotüüpide arvukuse maksimumid esinesid Peipsi järve puhul augustikuu ja Võrtsjärves juulis, kus veetemperatuurid ületasid 20° C.</p>			
Märksõnad: PCR, qPCR, Peipsi järv, Võrtsjärv, tsüanotoksiinid			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Carmen Kivistik		Speciality: Applied Biology of Aquatic and Terrestrial Ecosystems	
Title: Toxic cyanobacteria in Estonian large lakes			
Pages: 66	Figures: 28	Tables: 8	Appendixes: 2
Department: Chair of Hydrobiology and Fishery Field of research: Biosciences and Environment; B260 Supervisor: Kristel Panksep, <i>MSc.</i> Place and date: Tartu, 2018			
<p>Cyanobacterial blooms have become more frequent due to the climate change and eutrophication. There can be also toxic genotypes among bloom forming genera. Cyanotoxins can be harmful to human health and animals. These toxins may cause liver and gastrointestinal tract diseases, neurological disorders and in extreme cases even death. Traditionally, potentially toxic cyanobacteria have been evaluated with a microscope, but unfortunately, toxic and non-toxic genotypes are morphologically identical and thus it is not possible to distinguish them with microscope.</p> <p>The aim of this study was to detect and quantify potentially toxic genotypes of cyanobacteria in Lake Peipsi and Võrtsjärv through the vegetation period (May-October) in years 2011–2016 using molecular methods. Polymerase chain reaction (PCR) was used for the detection and real-time polymerase chain reaction (qPCR) for the quantification of potentially toxic genotypes.</p> <p>The results showed that the main dominant of the studied genus is <i>Microcystis</i>, forming &gt; 90% of detected toxic genotypes. Significant values of <i>Mcy</i> gene copies, which at times reached over 1,000,000 copies in a sample, were observed over the studied years. According to that, it can be assumed that significant concentrations of cyanotoxins could be found also in Lake Peipsi, in particular, during the accumulation of potentially toxic cyanobacterial biomass to the coastal areas.</p> <p>This study revealed that during the vegetation period, weather plays a major role in the total biomass of phytoplankton, including cyanobacteria. As a result, the abundance of toxic cyanobacteria is also influenced by the spring temperature rise and temperature drop in autumn. It is noted that cyanobacterial biomass peaks occur during the warmest periods. In this study cyanobacteria were generally dominant during the warmest months of the vegetation period. In Lake Peipsi, the maximum number of toxic genotypes occurred in August and in Võrtsjärv in July, where the water temperatures exceeded 20 °C.</p>			
Keywords: PCR, qPCR, lake Peipsi, lake Võrtsjärv, cyanotoxins			

# SISUKORD

<b>SISSEJUHATUS .....</b>	<b>6</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Sinivetikad .....</b>	<b>8</b>
1.1.2. Sinivetikaõitsengud .....	9
1.1.3. Tsüanotoksiinid .....	11
<b>1.2. Meetodid sinivetikate uurimisel .....</b>	<b>14</b>
1.2.1. Traditsioonilised meetodid .....	14
1.2.2. Molekulaarsed meetodid .....	15
1.2.3. Toksiinide mõõtmismeetodid .....	19
<b>1.3. Tsüanotoksiinide piirnormid joogi- ja suplusveele .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4. Eesti suurjärvede iseloomustus .....</b>	<b>20</b>
<b>2. MATERJAL JA METOODIKA .....</b>	<b>23</b>
2.1. Andmete ja materjali kogumine .....	23
2.2. Potentsiaalselt toksiliste sinivetikate analüüs molekulaarsete meetoditega .....	23
2.2.1. DNA eraldamine .....	23
2.2.2. Polümeraasi ahelrekatsiooni meetodika .....	24
2.3. Statistilised analüüsid .....	27
<b>3. TULEMUSED .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Peipsi järv .....</b>	<b>28</b>
3.1.1. Toiteainete mõju toksiliste sinivetikate esinemisele .....	28
3.1.2. Temperatuuri mõju toksiliste sinivetikate esinemisele .....	29
3.1.3. Klorofüllis sisalduse seos toksiinigeeni koopiate koguarvuga .....	30
3.1.4. Toksiliste genotüüpide esinemine potentsiaalselt toksiliste sinivetikate perekondades .....	30
3.1.5. Toksiliste sinivetikate esinemise sesoonsed ja aastatevahelised iseärasused .....	32
3.1.6. Võrdlus traditsiooniliselt kasutatavate meetodite tulemuste ja molekulaarsete meetodite tulemuste vahel potentsiaalselt toksiliste sinivetikate esinemisel .....	35
<b>3.2. Võrtsjärv .....</b>	<b>38</b>
3.2.1. Toiteainete mõju toksiliste sinivetikate esinemisele .....	38
3.2.2. Veetemperatuuri mõju toksiliste sinivetikate esinemisele .....	40
3.2.3. Klorofüllis sisalduse seos toksiinigeenide koopiate koguarvuga .....	40
3.2.4. Toksiliste sinivetikate esinemise sesoonsed ja aastatevahelised iseärasused .....	41
3.2.5. Toksiliste genotüüpide esinemine potentsiaalselt toksiliste sinivetikate perekondades .....	42

3.2.6. Võrdlus traditsiooniliselt kasutatavate meetodite tulemuste ja molekulaarsete meetodite tulemuste vahel potentsiaalselt toksiliste sinivetikate esinemisel .....	44
<b>4. ARUTELU .....</b>	<b>46</b>
4.1. Ilmastiku mõju vegetatsiooniperioodil toksiliste sinivetikate esinemisele .....	46
4.2. Toksiliste sinivetikate esinemine sõltub järve iseloomust.....	47
4.3. Sinivetikate potentsiaalse toksilisuse hindamine .....	48
4.4. Füüsikalise-keemiliste parameetrite mõju toksiliste genotüüpide esinemisele.....	49
4.5. Kokkupuuteoht tsüanotoksiinidega Eesti suurjärvedes .....	50
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>52</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>54</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS .....</b>	<b>56</b>
<b>LISA 1: VÕRTSJÄRVE SEIREPUNKTID .....</b>	<b>65</b>
<b>LISA 2: PEIPSI JÄRVE SEIREPUNKTID .....</b>	<b>66</b>

## SISSEJUHATUS

Kliima soojenemise ja jätkuva eutrofeerumise tagajärjel on tsüanobakterite ehk sinivetikate poolt põhjustatud veeõitsengud sagenenud. Ka Eesti veekogudes on õitsengud sagedased, esinedes ka külmadel suvedel. Sagedastest õitsengutest tingituna on vähenenud vee läbipaistvus, mis omakorda pärsib valguse levikut veekogus. Sageli põhjustavad õitsengud tugevat kõikumist ka vee hapnikusisalduses. Päevasel ajal, kui toimub aktiivne fotosüntees on veekogu hapnikuga rikastunud, kuid öisel ajal või vetikamassi lagunedes tarbitakse hapnikku ja see võib põhjustada tugevat hapnikuvaegust. Toimuvad ka muutused veekogu toiduahelas, sest toiduahelate võtmelüli, zooplankton, ei saa niitjaid ja koloonialisi sinivetikaid toidubaasina efektiivselt kasutada. Lisaks piiravad õitsengud veekogude kasutamist rekreatiivsel eesmärgil ja mõjuvad halvasti puhkemajandusele, sest õitsengutega kaasneb sageli muutus vee värvuses ja vetikamass võib põhjustada lagunedes väga ebameeldivat lõhna.

Õitsengut põhjustavate liikide seas võivad esineda toksilised tüved. Sinivetikate produtseeritavad toksilised ühendid kujutavad endast ohtu nii loomade kui inimeste tervisele. Tsüanotoksiine sisaldava vee allaneelamine võib põhjustada neuroloogilisi häireid, kahjustada maksa ja seedetrakti, tekitada nahalööbeid ja äärmisel juhul ka surma.

Veekogudes, kus veekihi tuule mõjul segunevad, jagunevad vetikarakud veesambas ühtlaselt. Kuid kui temperatuur tõuseb ning segunemine veesambas on minimaalne, on tsüanobakterid võimelised ujuvust reguleerides tõusma pinnakihti ning sel juhul võib potentsiaalselt toksiliste sinivetikate biomass pinnakihis kiiresti mitmekordistuda, seetõttu võib ka toksiinide kontsentratsioon olla pinnakihis kordi kõrgem. Tuulega kantakse toksiline vetikamass järve litoraalladele ja ka puhkamiseks kasutatavatesse randadesse.

Et anda hinnanguid suplus- ja joogivee ohutusele, on väga oluline tuvastada potentsiaalselt toksiliste sinivetikate olemasolu veekogus.

Traditsiooniliselt analüüsitakse proove mikroskoobiga, sinivetikate biomassi ja liigilise koosseisu alusel antakse hinnang potentsiaalsele toksilisusele. Kahjuks aga ei ole morfoloogiliste tunnuste alusel võimalik toksilisi ja mittetoksilisi tüvesid teineteisest eristada. Isegi samas õitsengumassis võivad toksilised ja mittetoksilised tüved koos eksisteerida. Üha enam kasutatakse toksiliste tüvede olemasolu tuvastamiseks veekogus

molekulaarseid meetodeid. Need meetodid on väga tundlikud ja võimaldavad hinnata toksilise õitsengu tekkeriski juba varajases staadiumis.

Antud töös keskenduti sinivetikate perekondadele *Microcystis*, *Dolichospermum* ja *Planktothrix*. Töö eesmärgiks on peamiste mikrotsüstiine ja anatoksiine tootvate sinivetikate tuvastamine ja arvukuse hindamine Eesti suurjärvedes kasutades molekulaarseid meetodeid. Töös võrreldakse potentsiaalselt toksiliste sinivetikate arvukust mikroskoopia ja pigmendianalüüsi andmetega. Vaadeldakse toksiliste sinivetikate esinemise ruumilisi, sesoonseid ja aastatevahelisi iseärasusi ning leitakse seosed peamiste keskkonnategurite ja toksiliste sinivetikate arvukuse vahel.

Töös on püstitatud kolm hüpoteesi, millest esimene väidab, et Eesti suurjärvedes maksamürki, mikrotsüstiini, toodavad potentsiaalselt kõige enam liigid perekonnast *Microcystis*. Teine hüpotees väidab, et toksiliste genotüüpide arvukus Peipsi järve erinevates osades ja Võrtsjärves on oluliselt erinev. Ning viimane, kolmas hüpotees väidab, et toksiliste genotüüpide arvukus Eesti suurjärvedes sõltub eelkõige vee temperatuurist ja toiteainete kontsentratsioonist vees.

Soovin väga tänada oma juhendajat, Kristel Panksepa, igakülgse abi ja toetamise eest. Lisaks soovin tänada ka kõiki, kes viisid läbi välitöid ning kelle välitööde andmeid sain enda magistritöös kasutada ja Reet Laugastet ning Peeter Nõgest mikroskopeerimise andmete eest.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Sinivetikad

Sinivetikad ehk tsüanobakterid (*Cyanobacteria*) on üherakulised, koloonialised või niitjad prokariootsed organismid. Fülogeneetiliselt kuuluvad sinivetikad gram(-) bakterite hulka. Oma energia saavad nad sarnaselt eukariootsetele mikrovetikatele fotosünteesi käigus. Tsüanobakteritel on fotosünteesiks ainulaadne antennpigmentide (fükotsüaniin, allofükotsüaniin, fukoerütriin) kogum, mida nimetatakse fükobiliproteiinideks. Enamikel sinivetikatel on domineerivaks pigment fükotsüaniin, millest on tingitud ka rakkude sinakas-roheline värvus. Klorofüllidest esineb sinivetikatel valdavalt klorofüll-a (Brodie & Lewis, 2007).

Tsüanobakterid on teadaolevalt vanimad hapnikku tootvad fototroofsed mikroorganismid Maal ning neil on olnud suur roll meie praeguse atmosfääri ja biosfääri kujundamisel. (Schopf, 2000). Oma pika evolutsiooni käigus on nad kohastunud elama ka väga erinevates elupaikades. Kõige rohkem esineb sinivetikaid parasvöötme ja subtroopilise kliimaga toiteaineterikastes järvedes, kuid neid võib leida jää- ja lumeväljadel, liustikel, mullas, kaljudel, kõrbetes, kuumaveeallikates, soolajärvedes ja ookeanides (Whitton & Potts, 2004).

Õitsenguid põhjustavad sinivetikad on üks edukamaid elustikurühmi Maal. Neil esineb edukaks toimetulekuks mitmeid füsioloogilisi kohastumusi nagu näiteks võime fikseerida õhulämmastikku, reguleerida raku ujuvust ja seeläbi muuta paiknemist veesambas, koguda varuks toiteaineid ning moodustada ebasobivate tingimuste üleelamiseks puhkerakke (Whitton & Potts, 2004; Reynolds, 2006). Samuti võivad sinivetikad toota sekundaarseid ühendeid, mis aitavad neil võidelda ebasoodsate tingimustega, sealhulgas fotoooksüdatsiooniga (Huisman *et al.*, 2005; Paerl & Otten, 2013). Erinevad kohastumused võimaldavad sinivetikatel olla üks edukamaid elustikuühmi ka jätkuva veekogude eutrofeerumise ja kliimamuutuste tingimustes (Paerl, 1988; Huisman *et al.*, 2005). Sinivetikatel on veekogu süsiniku-, lämmastiku- ja fosforiringes oluline ökoloogiline roll, kuid soodsate keskkonnatingimuste korral võivad tsüanobakterid veekogudes esile kutsuda ebasoodsaid ilminguid ning tekitada probleeme veeökosüsteemi teenuste tarbijatele (Stewart & Falconer, 2008).



### 1.1.2. Sinivetikaõitsengud

Kliimamuutused ja jätkuv eutrofeerumine soodustavad õitsengute tekkimist erinevates veekogudes (Paerl & Huisman, 2008; Paerl *et al.*, 2011). Primaarproduktiooni kasvu veekogudes on soodustanud põllumajanduse ja tööstuse areng ning linnastumine. See mõjutab mage- ja riimvee ökosüsteemides tsüanobakterite levikut ja domineerimist fütoplanktoni koosluses (Fogg, 1969; Huisman *et al.*, 2005).

Sinivetikate õitsengud mõjutavad oluliselt valguse levikut veekogus. Muutused vee läbipaistvuses pärsivad makrofüütide kasvu ja arengut ning mõjutavad negatiivselt selgrootute ja kalaliikide elupaiku (Reynolds, 1987). Tihe õitsengumass võib olla veekogus hapnikuvaeguse põhjuseks. Hapnikupuudus tekib õitsengumassi lagunedes ja öösiti, kui fotosünteesi ei toimu ja hapniku tootmise asemel seda aktiivselt hoopis tarbitakse. Selline hapnikurežiimi kõikumine võib olla kalade surma põhjuseks. Lisaks eelmainitule võib probleeme tekitada ka veitikamassi lagunemisel tekkiv ebameeldiv lõhn (Izaguirre & Taylor, 2004; Uwins *et al.*, 2007).

Osa sinivetikaid on võimelised produtseerima mürgiseid ühendeid ehk tsüanotoksiine. Toksilised sinivetikad mõjutavad veekogu ökosüsteemi ning kujutavad endast ohtu nii loomade kui ka inimese tervisele (Codd, 1995; Sivonen & Jones, 1999; Carmichael, 2001; Chorus, 2001). Koloonialised või niitjad sinivetikad ei ole zooplanktonile sobivaks toidubaasiks ning toksiinide esinemine vees vähendab toiduahela võtmelüli, zooplanktoni, eluvõimet (Freitasa *et al.*, 2014). On teada, et toksiinid akumulereuvad toiduahelas ning jõuavad seetõttu karpide, kalade ja teiste organismide vahendusel ka inimese toidulauale (Metcalf & Codd, 2014). Toksiine sisaldava vee allaneelamine võib põhjustada inimestele ja loomadele tõsiseid terviseprobleeme, näiteks kahjustada maksa ja seedetrakti, kutsuda esile neuroloogilisi häireid, soodustada vähiteket ning põhjustada isegi surma (Carmichael, 2001; Cox *et al.*, 2003; Huisman *et al.*, 2005; Metcalf & Codd, 2012).

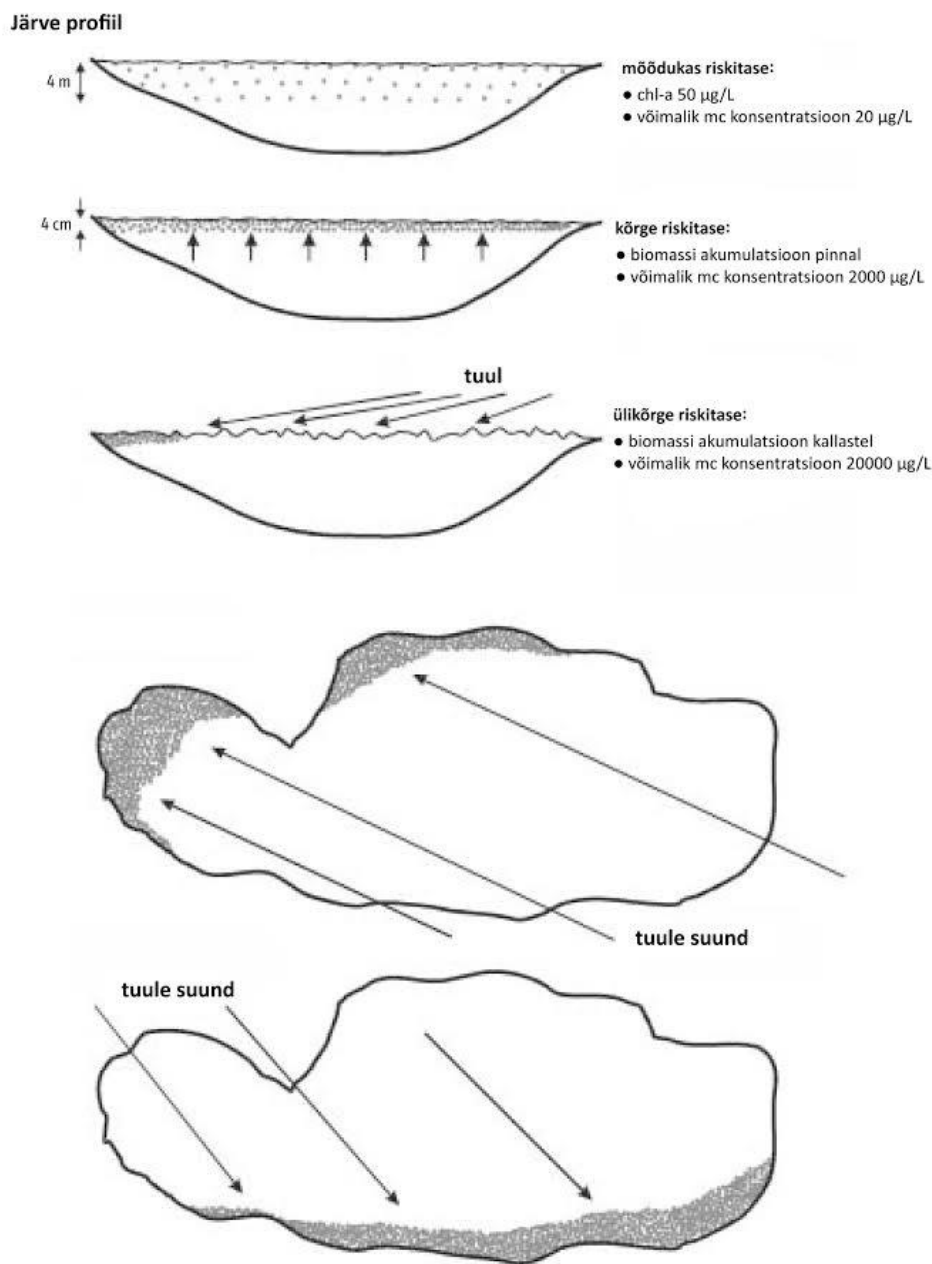
Tõusvad temperatuurid, veekogu ulatuslikum vertikaalne kihistumine ja atmosfääris CO<sub>2</sub> koguse tõus suurendavad tõenäoliselt sinivetikate domineerimist paljudes veekeskkondades (Robarts & Zohary, 1987; Paerl & Huisman, 2008).

Tsüanobakterid on tõenäoliselt jätkuvalt edukad ka kliima edasise soojenemise tingimustes. Nende kasvukiirus tõuseb kõrgematel temperatuuridel, samas kui otseste konkurentide – eukarüootsete mikrovetikate – meelistemperatuurid jäävad alla 20 °C (Litchman *et al.*, 2010;

Paerl & Huisman, 2008; Reynolds, 2006). Soodsatel temperatuuridel aga tuleb sinivetikatel konkureerida eluks vajalike ressursside pärast teiste eukarüootsete primaarprodutsentidega. Seega on täheldatud, et kui teiste primaarprodutsentide kasvuoptimum hakkab langema, saavutavad sinivetikad oma optimumi (Elliott *et al.*, 2006; De Senerpont Domis *et al.*, 2007; Jöhnk *et al.*, 2008).

Pinnavee soojenemine tugevdab veekogu vertikaalset kihistumist ning vähendab vee viskoossust. Vertikaalse kihistumise tugevus sõltub vee tiheduse erinevusest pinnakihi (epilimnion) ja sügavamate veekihtide (hüpimnion) vahel. Temperatuuri tõustes vee tihedus epilimnionis väheneb, kihistumine tugevneb (De Stasio *et al.*, 1996; Peeters *et al.*, 2007). Paljud sinivetikaliigid suudavad veesamba kihistumist ja vee viskoossuse vähenemist ära kasutada. Teatud tingimustes võivad mõned tsüanobakterid moodustada gaasivakuole, mis võimaldavad neil reguleerida ujuvust ja teatud määral kontrollida oma asetsemist veesambas. See annab neile eelise teiste fütoplanktoni liikide ees (Walsby, 1975; Walsby *et al.*, 1997). Madalates tuulele avatud veekogudes ei oma ujuvuse reguleerimise võime erilist eelist, kuna tuul segab veesamba läbi ja vetikarakud on võrdlemisi ühtlaselt jaotunud. Kuid soojadel tuulevaiksetel ilmadel võivad tsüanobakterid raku ujuvust reguleerides tõusta pinnakihti ning tekitada ulatusliku õitsengu. Veeõitsengus võib esineda ka toksiline tootvaid sinivetikaliike ning sel juhul võib toksiinide kontsentratsioon tõusta pinnakihis võrreldes muu vesambaga kordi kõrgemaks. Kui toksiline õitsengumass tuule abil litoraallaladele ja randadesse kantakse võib tsüanotoksiinidest tulenev risk inimeste ja loomade tervisele olla ülikõrge (joonis 1) (Chorous & Bartram, 1999). Sellist olukorda on täheldatud ka Eestis. Peipsi järves läbi viidud uuringus leiti, et ranna-aladele uhutud õitsengumassis oli mikrotsüstiini kontsentratsioon üle  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tanner *et al.*, 2005). See ületab Maaailma Terviseorganisatsiooni (WHO – *World Health organisation*) poolt sätestatud piirväärtuse ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) mitmesaja kordselt (WHO, 1998).

Ulatuslike õitsengute korral on nõudlus fotosünteesiks vajamineva süsihappegaasi ( $\text{CO}_2$ ) järele suur. Nõudluse tõus  $\text{CO}_2$  järele aga piirab vaba  $\text{CO}_2$  kättesaadavust ning see võib hakata limiteerima primaarproduktsiooni tõusu. Antud juhul on eelis pinnakihis olevatel sinivetikatel, kes suudavad fikseerida süsihappegaasi. Veekogudes, kus on ulatuslikud sinivetikaõitsengud suureneb  $\text{CO}_2$  tarbimine ja seeläbi tõuseb vee pH (Caldeira & Wickett, 2004; Orr *et al.*, 2005).



**Joonis 1:** Tsüanobakterite biomassi akumulatsioon soodsatel keskkonnatingimustel (Chorous & Bartram, 1999)

### 1.1.3. Tsüanotoksiinid

Tsüanotoksiinid on mitmekesine grupp looduslikest mürkidest, nii toksikoloogilisest kui keemilisest vaatepunktist. Sinivetikad on võimelised tootma ebatavalisi metaboliite, mille

funktsioon looduses on ebaselge. Võib arvata, et sinivetikad toodavad mürgiseid ühendeid mõjutamaks ümbritsevat elustikku, selleks et jääda ellu konkurentsivõimsete toiteainete ja valguse limitatsiooni korral. On kindlaks tehtud, et sinivetikate toodetavad mürgid võivad olla tunduvalt ohtlikumad maismaaloomadele võrreldes vee-elustikuga (Chorus & Bartram, 1999). Tsüanotoksiinid on väga tugevad toksiidid, mis võivad põhjustada surma mõne minuti jooksul (neurotoksiinid) või mõne tunni jooksul (hepatotoksiinid) loomadel, kes on saanud akuutse annuse (Sivonen, 2009).

Enamik toksiidid tootvaid sinivetikaid on planktilised mage- või riimvee organismid. Toksiliste tüvedega sinivetikaid on leitud ka põhjaveest, harvem maismaaelupaikadest. Toksiidid tootvad tsüanobakterid hõlmavad planktilisi N<sub>2</sub>-fikseerivaid perekondi *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, mitte-N<sub>2</sub>-fikseerivaid perekondi *Microcystis* ja *Planktothrix* ja bentilise eluviisiga N<sub>2</sub>-fikseerivat perekonda *Lyngbya* (Sivonen, 2009).

Sinivetikate kõrge biomassi ja produtseeritavate ühenditega seostatavaid mürgistusjuhtumeid täheldati juba varem kui toksiidimolekule esmakordselt kirjeldati. Kõige sagedamini produtseeritavate toksiidide, anatoksiin-a ja mikrotsüstiini, struktuure uuriti juba ligi 40 aastat tagasi (Meriluoto *et al.*, 2017). Närvimürgi anatoksiin-a molekuli struktuur kirjeldati aastal 1977 ja maksamürgi mikrotsüstiin-LA molekuli struktuur 1984. aastal. Seejärel kasvas toksiidide ja nende erivariantide struktuurikirjelduste hulk plahvatuslikult (Carmichael, 1992; Sivonen & Jones, 1999; Harada *et al.*, 2004).

Tsüanotoksiinid võib jagada gruppidesse mitmeti. Toksiini toimemehanismi järgi – hepato-, neuro- ja dermatotoksiinideks või vastavalt ühendi keemilisele struktuurile – tsüklilisteks peptiidideks, alkaloidideks või lipopolüsahhariidideks (Carmichael, 1992; Chorus & Bartram, 1999; Codd *et al.*, 1999). Enamik sinivetikate produtseeritavatest mürgidest on madalmolekulaarsed, jäädes suurusvahemikku 118 Da - ~1000 Da (Meriluoto *et al.*, 2017).

**Maksamürgid – mikrotsüstiinid ja nodulariinid.** Tsüanotoksiinide uurimisel on enim tähelepanu pälvinud tsüklilised heptapeptiidid. Need on maksa- ehk hepatotoksiinid, millest levinumad on mikrotsüstiinid ja nodulariinid. Mikrotsüstiinid on oma nime saanud *Microcystis aeruginosa* järgi, tsüanobakteri, mille toksiid eraldati ja kirjeldati esimesena (Sivonen, 2009). Nodulariinid on tsüklilised pentapeptiidised hepatotoksiinid, mis sarnanevad mikrotsüstiinidele nii struktuurilt kui funktsioonilt (Runnegar *et al.*, 1995).

Magevee ökosüsteemides paistavad olema mikrotsüstiinid levinuimaks produtseeritavatest mürgistest ühenditest (Meriluoto *et al.*, 2017). Kõige enam toodavad mikrotsüstiine liigid perekondadest *Microcystis*, *Planktothrix* ja *Dolichospermum*. Need perekonnad on levinud Euroopas, nii Lõuna- kui Põhja-Ameerikas, Aafrikas ja Aasias (Falconer *et al.*, 2005).

Nii mikrotsüstiinid kui nodulariinid on eukarüootide seedesüsteemides töödeldamatud ning toksiidid akumulieeruvad maksas (Runnegar *et al.*, 1995). Äge mürgitus väljendub maksakoe kahjustustes, millest on tingitud maksa verevaegus. See võib organi viia hemorraagilise šokini (Falconer *et al.*, 2005; Codd *et al.*, 1999; Svirčev *et al.*, 2015). Mikrotsüstiinid on väga stabiilsed ühendid ning vastupidavad ka keetmisele. Seega kujutavad nad suurt ohtu riikides, kus kogutakse joogivett pinnaveekogudest (Falconer *et al.*, 2005).

**Närvimürgid – anatoksiin-a ja anatoksiin-a(s).** Neurotoksiinid on kiire toimega alkaloidsed ühendid. Peamisteks neurotoksiinideks on anatoksiin-a ja anatoksiin-a(s). Neid neurotoksiine on enim leitud kolmes planktiliste niitjate tsüanobakterite perekonnas *Dolichospermum*, *Aphanizomenon* ja *Planktothrix* (Falconer *et al.*, 2005).

Anatoksiin-a on neuromuskulaarne blokaator, mis põhjustab surma hingamiseldkonna paralüüsi tagajärjel (Carmichael & Mahmood 1984). Anatoksiin-a seondub neurotransmitteriga ning seetõttu pole võimeline vastav ensüüm ühendit lagundma, mille tagajärjel tekivad mürgitunud loomal lihastõmbused ning õhupuudus. Anatoksiin-a(s) inhibeerib vastava ensüümi aktiivsust, põhjustades loomadel krampe ja sooltoru ärritusest tingitud liigset süljeeritust, samuti surma hingamisteede seiskumise tõttu (Codd *et al.*, 1999).

Antud toksiidide ühendid on keskkonnas väga stabiilsed ning neid on leitud puhkepiirkondades avalikult kasutatavates järvedes nii Euroopas kui Põhja-Ameerikas. Sellest tulenevalt tekib inimesele oht saada anatoksiini mürgitus vett alla neelates ujudes või mõne veespordialaga tegeledes (Chorus *et al.*, 2000).

## 1.2. Meetodid sinivetikate uurimisel

### 1.2.1. Traditsioonilised meetodid

**Mikroskoopia.** Veeproovide mikroskoopiline uurimine on hea meetod liigilise koosseisu määramiseks. Saadud teave annab märku ka potentsiaalsetest toksilistest liikidest ning võimaldab valida edasise proovi uurimis- või analüüsimeetodi (Utermöhl, 1958).

Konserveeritud rakkude otsene loendamine toimub tavaliselt Utermöhli loendamistehnika abil, kasutades loenduskambrit ja invertmikroskoopi (Utermöhl, 1958). See sobib hästi rakkude eristamiseks ja on laialdaselt tunnustatud üheks kõige usaldusväärsemaks loendusmeetodiks. Kasutatavad loenduskambrid ja setitustorud on kaubanduslikult kättesaadavad. Utermöhli meetod eeldab, et rakud on loenduskambri põhjale langenud Poissoni jaotuse (harva esinevate sündmuste jaotusseaduse) kohaselt. Tulemuste kvantifitseerimiseks tuleb arvutada rakkude arv 1 liitri kohta (Karlson *et al.*, 2010). Kui rakkude kontsentratsioon on suur, tuleb proov lahjendada (Chorus & Bartram, 1999).

Proovide võrdlemiseks piirkonniti või aastaajati on oluline, et alati loendataks konkreetseid liike sama suurendusega ja sama loendusviisi kasutades. Eriolukordades ei pruugi see siiski olla võimalik ja tuleb kasutada erinevaid suurendusi (Karlson *et al.*, 2010).

Utermöhli meetodi eelisteks võib pidada võimalust hinnata fütoplanktoni kooslust nii kvalitatiivselt kui kvantitatiivselt. Kuid organismide liigini määramine eeldab suurte teadmiste ja kogemustega personali (Chorus & Bartram, 1999). Mikroskopeerimine on võrdlemisi aeganõudev ja veeproovi sedimentatsiooniaeg takistab proovide kohest analüüsi. Lisaks pole mikroskoobi abil võimalik väiksuse tõttu analüüsida pikoplanktonit ega eristada toksilisi tsüanobaktereid mittetoksilistest, kuna toksiiniproduksiooniks vajaliku geeni olemasolu või puudumine raku morfoloogias ei väljendu (Sivonen & Jones, 1999; Karlson *et al.*, 2010).

**Fotosünteesipigmentide sisalduse määramine.** Klorofüll-*a* (edaspidi Chl-*a*) on fotosünteesi pigment, mis leidub nii eukarüootsete kui prokarüootsete (sinivetikad) organismide rakkudes. Seega on Chl-*a* sisalduse määramine usaldusväärne allikas kogu fütoplanktoni biomassi hindamiseks (Kruskopf & Flynn, 2006).

Enamasti moodustab Chl-*a* 0,5-1% fütoplanktoni kuivkaalust, kuid see varieerub vastavalt organismide füsioloogilisele seisundile (tõuseb, kui valguse intentsiivsus on madal). Klorofüll-i sisalduse mõõtmine annab hinnagu kogu fütoplanktoni biomassi kohta. Ainult

sinivetikate biomassi hindamiseks sobib sinivetikatespetsiifiline pigment – fükotsüaniin (Berman, 1972).

Analüüsimiseks tuleb klorofüll rakkudest ekstraheerida, selleks kasutatakse orgaanilisi lahusteid nagu metanool, etanool või atsetoon (Ritchie, 2008). Sellele järgneb Chl-*a* sisalduse määramine erinevate laialt levinud meetoditega nagu spektrofotomeetria, fluorimeetria või vedelik-kromatograafia (Sartory & Grobbelaar, 1984; ISO 10260, 1992).

### 1.2.2. Molekulaarsed meetodid

**Polümeraasi ahelreaktsiooni (edaspidi PCR) meetod.** DNA paljundamise meetodi leiutasid K. Kleppe ja H.G Khorana aastal 1971, kuid PCR meetodi arendas laialdaselt rakendatavaks meetodiks aastal 1983 välja ameeriklasest biokeemik Kary Mullis, kes pälvis selle eest 1993. aastal Nobeli preemia (Garibyan & Avashia 2014).

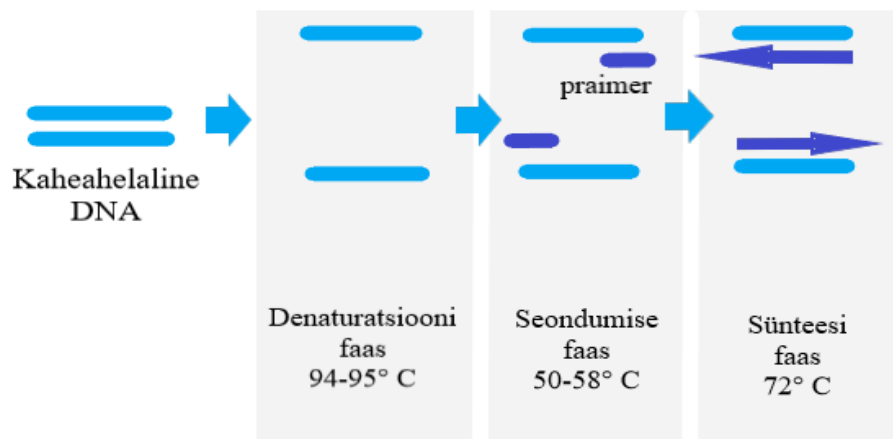
PCR on üks tõhusamaid tehnoloogiaid molekulaarbioloogias, mille abil on võimalik kindlat DNA segmenti kopeerida mõne tunniga ligi miljonikordseks (Herrero & Flores, 2008).

Meetodi eelisteks on protsessi kiirus, lihtsus, automatiseeritus, võrdlemisi madal hind ning ülitundlikkus. Meetodi rakendamiseks piisab juba väga väikesest kogusest algmaterjalist (näiteks vaid ühes rakus sisalduv DNA). Meetodi puudusteks võib aga pidada seda, et algselt on vaja teada uuritava DNA järjestust, mille alusel sünteesida reaktsioonisegus kasutatavad praimerid. Meetodi rakendamine nõuab erinevate faktorite ja PCR-i tingimuste optimeerimist ning ülimat ettevaatust saastuse vältimiseks. Samuti pole välistatud DNA sünteesi käigus tekkivad vead (Herrero & Flores, 2008).

PCR meetodi kasutamisel on vajalikud viis põhilist komponenti (Garibyan & Avashia 2014):

1. DNA, mida soovitakse paljundada
2. Praimerid, mis on komplementaarsed DNA lõiguga, mida tahetakse paljundada.
3. DNA nukleotiidid, millest ehitatakse uus DNA lõik.
4. Termotabiilne polümeraas
5. Reaktsioonipuhver, mis tagab vajaliku keskkonna reaktsiooni toimumiseks.

DNA paljundamiseks kasutatakse kuumutamise ja jahutamise ehk termotsükli süsteemi (joonis 2).



**Joonis 2:** Illustratsioon PCR meetodi tööpõhimõtte kolmest faasist (Thermo Fisher Scientific järgi).

Protsessi kolm peamist termofaasi on:

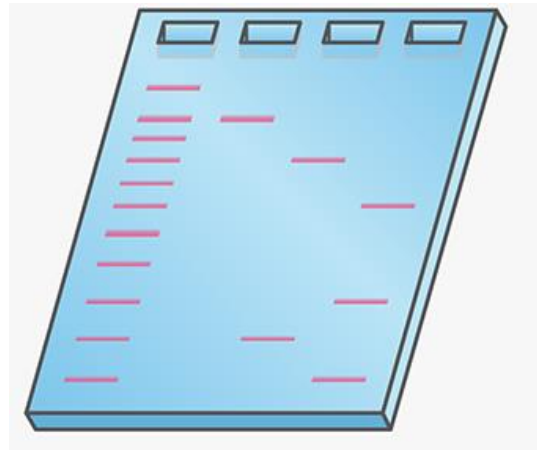
Denatureerimise faas, mille käigus uuritavat DNA-d sisaldav reagentide segu kuumutatakse vesiniksidemete lõhkumiseks. Selle tulemusena DNA kaksikheeliks lõhutakse kaheks üheaheelaliseks lõiguks (Holland *et al.*, 1991; Garibyan & Avashia, 2014).

Seondumise faasis jahutatakse reagentide segu 50-65°C-ni (temperatuur on sõltuv praimerite sulamistemperatuurist). See võimaldab praimeritel kinnituda vastava komplementaarsusega piirkonda. Praimerid, mida antud faasis kasutatakse, on lühikesed nukleotiidsed järjestused, mis paarduvad DNA molekuli ühe ahelaga, kindla komplementaarsusega piirkonnas. Selle tulemusena tekib vaba (3'-OH) ots, millele DNA- polümeraas (termostabiilne ensüüm) saab juurde lülitada uusi nukleotiide ja sünteesida olemasoleva ahelaga komplementaarse DNA ahela (Holland *et al.*, 1991; Garibyan & Avashia, 2014).

Sünteesi faasis tõstetakse temperatuur 72°C kraadini. Selles etapis sünteesib termostabiilne DNA- polümeraas praimeritevahelisele üksikahelalise DNA lõigule komplementaarse lõigu, muutes DNA taas kaheahelaliseks. Selles faasis kasutatakse reaktsioonisegusse lisatud nukleotiide (komplementaarsusprintsipi alusel (A-T; G-C) (Holland *et al.*, 1991; Garibyan & Avashia 2014). Neid kolme faasi korratakse 20-40 korda ning DNA kogus kasvab eksponentsiaalselt igas tsüklis. Kordustsüklitele järgneb DNA sünteesi lisaetapp, 72°C juures 10 minutit, et sünteesida lõpuni kõik üksikahelaliseks jäänud lõigud (Garibyan & Avashia 2014).



Peale PCR meetodi rakendamist kasutatakse tulemuste vaatamiseks agarose-geelelektroforeesi meetodit, mis võimaldab kontrollida produtseeritud DNA fragmentide suurust ja hinnata kogust. Geelelektroforees on "molekulaarsesse sõela" sisestatud laenguga osakeste (DNA fragmentide) eraldamine elektriväljas. Eraldunud fragmendid muutuvad UV-valguses nähtavaks, selleks värvitakse geeli eelnevalt UV-tundliku DNA-ga seostuva värviga (joonis 3) (Garibyan & Avashia 2014).



**Joonis 3:** Illustratsioon horisontaalsel geelil PCR produktide visualiseerimisest (Yılmaz *et al.*, 2012).

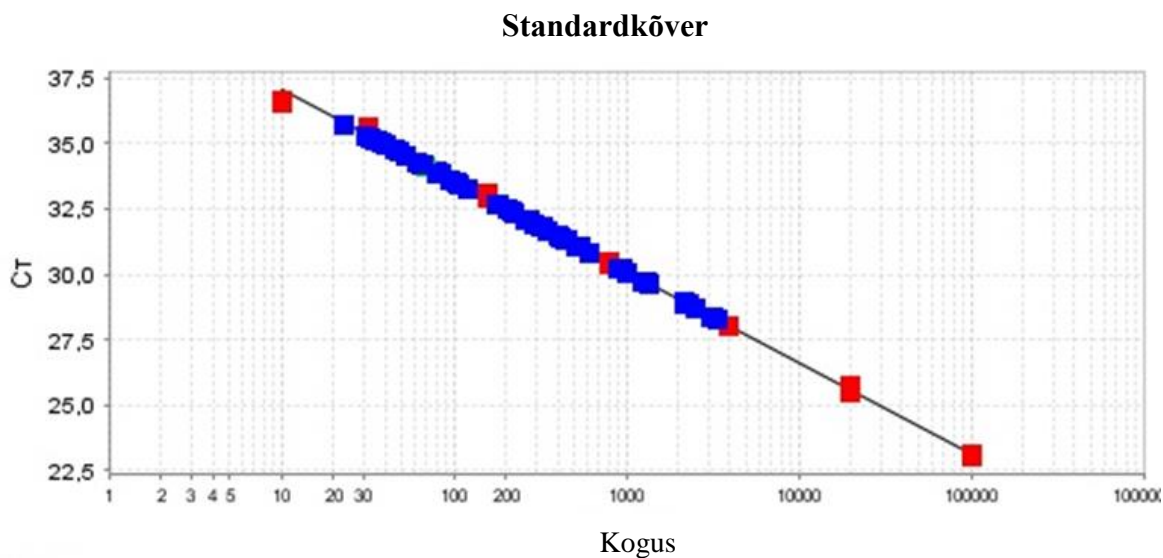
**Reaal-aja kvantitatiivne (qPCR) meetod.** QPCR-i meetod baseerub oma põhimõttelt eelnevalt kirjeldatud PCR-meetodil. QPCR on väga tundlik ja täpne viis märklaudgeenide arvukuse määramiseks proovis. Lisaks võib qPCR meetod anda ülevaate sellest, millised keskkonnategurid soodustavad või takistavad toksiliste liikide kasvu ja aitavad mõista füsioloogilisi ja ökoloogilisi parameetreid, mis reguleerivad tsüanotoksiinide tootmist (Heid *et al.*, 1996). Kui PCR meetodi puhul on võimalik PCR produkti detekteerida alles peale reaktsiooni lõppu lisaetapi abil, siis qPCR meetodi puhul mõõdetakse kordistatava (amplifitseeritava) DNA kogust reaalajas peale igat tsüklit fluorestentsmarkerite abil. Fluoretsentssignaal suureneb läbi protsessi proportsionaalselt tsükliite arvuga (Heid *et al.*, 1996). Peamiselt kasutatakse kaheaahelalise DNA-ga seonduvad värve (mittespetsiifiline seondumine) ning TaqMan® tehnoloogiat (järjestusspetsiifiline seondumine) (Holland *et al.*, 1991).

Mittespetsiifilise seondumisega värvid (SYBR®Green; EvaGreen®; CYGREEN™) seonduvad kogu proovis sisalduva kaheaahelaliste DNA lõikudega. PCR-i abil kordistatakse DNA märklaudjärjestust, misjärel seondub värv kõigi kaheaahelaliste DNA lõikude uute koopiatega. Selle tulemusena suureneb mõõdetava fluoretsentsi intensiivsus, mis on proportsionaalne toodetud PCR-produkti kogusega. Peamiseks puuduseks mittespetsiifilise seondumisega värvide kasutamisel on see, et võivad tekkida valepositiivsed signaalid; s.o. kuna SYBR-värv seostub mistahes kaheaahelalise DNA-ga, võib see seonduda ka mittespetsiifiliste kaheaahelaliste DNA järjestustega. Seetõttu on äärmiselt oluline, et

kasutuses oleks hästi disainitud spetsiifilised praimerid. Mittespetsiifilise seondumisega värvide kasutamisel tuleb läbi viia ka sulamiskõvera analüüs (*Melting Curve analysis*) kontrollimaks fluorestsentsekspressiooni täpsust ja spetsiifilisust (Ha *et al.*, 2009).

Spetsiifilise seondumisega TaqMan® tehnoloogia põhineb fluorestsentsmärgisega tähistatud spetsiifilise järjestusega sondil (*probe*). Reaktsioonisegus kasutatakse lisaks tavapärastele praimeritele lühikest järjestus-spetsiifiliselt seonduvat DNA lõiku, mis on märgistatud nii 5' kui ka 3' otsast. Järjestuse 5' otsas asub fluorestseeruv värv ning 3' otsas fluorsetsentsi kustutaja. Kui TaqMan sond on sihtmärkjärjestusega seotud, siis fluorestsents summutatakse. QPCR-i reaktsiooni käigus TaqMan sond eraldub sihtmärkjärjestuselt ning tekitab fluorestsentssignaali mida qPCR masin detekteerib ja mõõdab. Iga PCR tsükli vältel vabaneb järjest rohkem värvaine molekule, mille tulemuseks on fluorestsentsi intensiivsuse suurenemine ja see on proportsionaalne sünteesitud DNA kogusega.

Märklaudgeenide arvukuse hindamisel kasutatakse peamiselt standardkõvera meetodit. Kindla DNA kontsentratsiooniga puhaskultuurist tehakse kaliiberlahjendus, kus on teada täpne märklaudgeeni koopiite arv mikrolitri kohta. Kaliiberlahjendusest valmistatakse omakorda kümnekordsete lahjenduste seeria abil standardkõver (joonis 4).

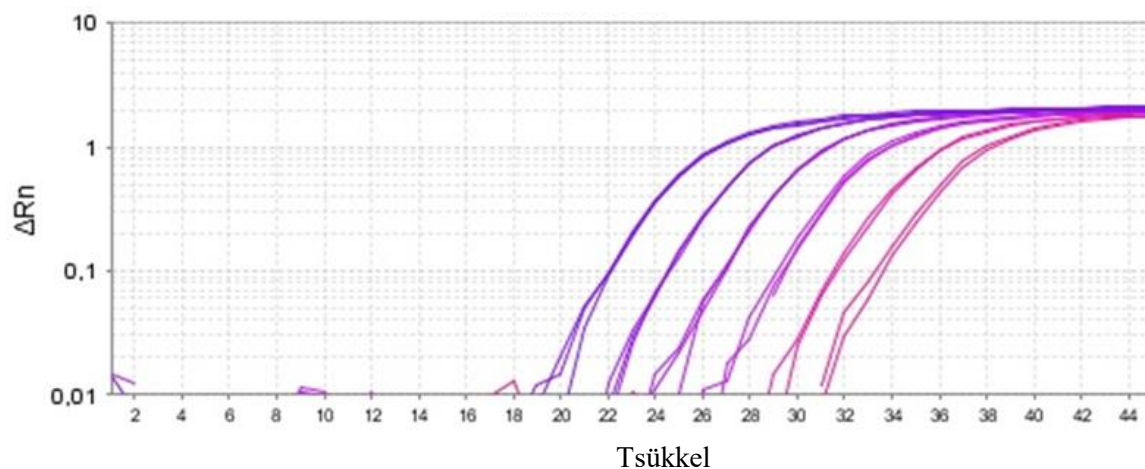


**Joonis 4:** Illustratsioon standardlahuste kaliiberkõverast (Erakogu).

QPCR meetodis kasutatakse protsessi läbiviimiseks samuti termotsükli süsteemi. Tsükli numbrit, mille juures amplifikatsiooni graafik ristub fluorestsentsekspressiooni lävendiga nimetatakse lävitsükliks ( $C_t$  – *threshold cycle*). Mida suurem on proovis märklaudgeeni kogus, seda varem avaldub graafikul lävitsükkel (joonis 5). Proovide märklaudgeenide

arvukus arvutatakse vastava tarkvara abil, mis kasutab võrdluseks standardlahuste lävitsükli väärtusi (Heid *et al.*, 1996).

#### Amplifikatsiooni graafik



**Joonis 5:** Illustratsioon amplifikatsioonigraafikust (Erakogu).

#### 1.2.3. Toksiinide mõõtmismeetodid

Toksiinide kvantitatiivsed analüüsid põhinevad peamiselt füüsikalise-keemilistel ja biokeemilistel analüüsidel ning biotestidel (Lawton *et al.*, 1994). Biokeemilised meetodid on sobivad kiireks toksiini olemasolu tuvastamiseks veeproovis. Saadaval on ensüümidega seotud immunosorbentanalüüsid (ELISA) ja proteiini fosfataasi inhibeerimise analüüsid (PPIA). Mõlemad meetodid annavad toksiinikontsentratsioonide poolkvantitatiivsed hinnangud (Törökné, 2000). Lisaks kasutatakse ka elusorganismide peal katsetatavaid bioteste (Schantz *et al.*, 1958; Kiviranta *et al.*, 1991; Kós, *et al.*, 1995). Biokeemilised meetodid ja biotestid ei suuda tuvastada toksiinide individuaalseid variante ja toksiinide koguste hinnang on vähem täpne võrreldes analüütiliste meetoditega (Sangolkar *et al.*, 2006).

Analüütilistest toksiini tuvastamise meetoditest kasutatakse enim kõrgsurve vedelikkromatograafiat (*HPLC - high-performance liquid chromatography*). See on eraldamistehnoloogia, kus analüütide lahustunud segu (proov) eraldatakse üksikuteks komponentideks. HPLC kasutab lahutusvõime saavutamiseks polaarsust, laengut ja analüüdi osakeste suuruste erinevust. Ekspertide poolt soovitatud vedelikkromatograafia koos massispektromeetriaga (LC-MS) on äärmiselt tundlik ja selektiivne meetod tsüanotoksiinide

analüüsimiseks (Spoof *et al.*, 2003), praktiliselt kõiki tsüanotoksiine saab massispektromeetria (MS) abil eristada (Poon *et al.*, 1993; Meriluoto, 2017).

Kõik analüütilised meetodid sõltuvad olemasolevatest standardmaterjalidest, kuid kahjuks on ainult väike osa kõigist teadaolevatest tsüanotoksiinide variantidest kaubanduslikult kättesaadavad (Soares *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2010).

### **1.3. Tsüanotoksiinide piirnormid joogi- ja suplusveele**

Inimesed võivad tsüanotoksiinidega kokku puutuda joogivett tarbides ning veekogudes supeldes (Chorus *et al.*, 2000). Lisaks võivad toksiid jõuda inimeseni toiduahela kaudu, s.t kalade, rannakarpide ja suuremate koorikloomade söömisel (Ibelings & Chorus, 2007). Tervise- ja keskkonnariskide hindamiseks andis Maailma Terviseorganisatsioon (WHO) 1998. aastal välja esimese infomaterjali mikrotsüstiini piirnormi ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) kohta joogivees (Chorus & Bartram, 1999). Sama piirnormi kasutatakse ka suplusvee kohta, kuna ujuja võib ühe supluskorra jooksul neelata 100-200 ml vett, allaneelatava vee kogus võib olla veesportlasega tegelejatel suurem (WHO, 1998).

Rahvusvaheline Vähiuuringute Amet (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) klassifitseeris 2006. aastal mikrotsüstiini võimalikuks inimestele kantserogeenseks ühendiks. Siiski on senised uuringud ebapiisavad, et teha järeldusi kantserogeensete riskide kohta (International..., 2010).

### **1.4. Eesti suurjärvede iseloomustus**

**Peipsi järv.** Eesti suurim pinnaveekogu, Peipsi järv, asub 5. kohal Euroopa looduslike järvede seas. Järv koosneb kolmest osast: Peipsi Suurjärvest, Pihkva järvest ja neid ühendavast Lämmijärvest. Kõik kolm osa on omavahel selgesti eristatavad. Peipsi järve valgala on väga ulatuslik, enam kui  $47\,800 \text{ km}^2$  suuruselt territooriumilt kogub järv oma vee. Järvel on umbes 30 suuremat sissevoolu, neist suurimad on Velikaja ja Emajõgi. Väljavool toimub Narva jõe kaudu. Peipsi järv ja tema valgala on tugeva majandustegevuse mõju all. Paljud pinnaveekogud on heitvee eesvooludeks maa-asulate olmevetele ja valdavalt toiduainetetööstuse reovetele. Lisaks ka põllumajanduslikust hajureostusest lisandub vette

toiteaineid ja ohtlikke keemilisi ühendeid, mis avaldavad mõju veekogu ökosüsteemile (Loigu *et al.*, 2008). Peipsi järve vesi on nõrgalt aluseline (pH ~ 8,0-8,6) ning vee pH keskmised väärtused järveosades ei erine (Milius & Haldna, 2008).

Peipsi veekeemia ja elustiku kohta on viimase poole sajandi jooksul kogutud ulatuslik andmestik. Järvel toimub igal aastal vegetatsiooniperioodil (mai-oktoober) hüdrokeemiline ning –bioloogiline seire, kus kogutakse proove seitsmest proovipunktist. Viimase aastakümne seiretulemused ja teadusuuringud on näidanud, et Peipsi järve ökosüsteem on ebastabiilne ja tema tulevik on raskemini prognoositav kui varem arvatud. Peipsi unikaalse ökosüsteemi tasakaalu kadumine kujutab potentsiaalset riski ühelt poolt bioloogilisele mitmekesisusele, ökosüsteemi tervisele ja funktsioneerimisele, teisalt inimesele olulistele kalavarudele ja magevee ressursile.

**Võrtsjärv.** Võrtsjärv on Eesti suuruselt teine järv. Seisundi hindamise seisukohast teeb järve eriliseks just tema suurus ja madalus. Kokku 18 sissevoolu toovad Võrtsjärve vett ligi 3374 km<sup>2</sup> suuruselt valglalt ning väljavooluks on Emajõgi. Keskmiselt on Võrtsjärv jääkatte all novembrist aprillini. Vesi järves on kergelt aluseline (pH ~ 8) ja kõrge puhverdusvõimega - pH kõikumised ei ole suured. Igakuiseid hüdrokeemilisi ja hüdrobioloogilisi uuringuid hakati järvel läbi viima 1965. aastal kuid riiklikku seireprogrammi kaasati Võrtsjärv alles 1994. aastal. Selle raames kogutakse Võrtsjärvest proove aastaringselt kord kuus seirepunktist nr 10. Vastavalt keskkonnaministri 28. juuli 2009. a määrusele nr 44 kuulub Võrtsjärv omaette tüüpi VI (järve tüüp vee raamdirektiivi järgi), mille alusel on Võrtsjärv mineraalmaal paiknev heledaveeline keskmise karedusega madal järv. (Haberman *et al.*, 2004; EELIS, 30.04.2018).

Jäävabal ajal on tuulel ja lainetel oluline mõju Võrtsjärve vee koostisele: palju on põhjasetteist resuspendeerunud sestonit ja vesi on hägune. Suvine vee läbipaistvus on harva üle ühe meetri. Samas, tänu pidevale segamisele on gaasirežiim järves hea. Madala veeseisu juures külmunud järves võib aga külmema talve korral hapnik märtsiks otsa saada ja kalade suremise oht tekkida. Pikaajaliste kliimamuutuste mõjul on prognoositav Võrtsjärve väga kõrge veetaseme harvemaks muutumine, sest talved muutuvad keskmiselt lühemaks ja kevadine suurveetipp madalamaks. Toiteainete väliskoormus järvele oli suurim 1980. aastatel, 1990. aastail aga vähenes see tublisti, eelkõige tänu põllumajandusliku tegevuse vähenemisele ja asulate heitvee paremale puhastamisele. Viimasel kümnendil, eriti alates 2006. aastast, on üldfosfori kontsentratsioonid suve- ja sügiskuudel selgelt kahanenud.

Uuritavate järvede morfomeetria ja peamised seire käigus mõõdetavad keskkonnanäitajad on toodud tabelis 1.

**Tabel 1:** Peipsi järve ja Võrtsjärve iseloomustav koondtabel (EELIS, 2018).

	<b>Peipsi Suurjärv</b>	<b>Lämmijärv</b>	<b>Pihkva järv</b>	<b>Võrtsjärv</b>
Pindala (km <sup>2</sup> )	2611	236	708	269
Keskmine sügavus (m)	8,3	2,5	3,8	2,8
Suurim sügavus (m)	12,9	15,3	5,3	6
Läbipaistvus (m)*	1,8	0,9	0,65	0,74
Klorofüll (µg L <sup>-1</sup> )*	26,3	38,2	43,2	43,25
Üldfosfor (mg L <sup>-1</sup> )*	0,04	0,07	0,12	0,04
Üldlämmastik (mg L <sup>-1</sup> )*	0,71	0,87	1,07	0,99
N-P suhe*	22	12	9	25

\*2011-2016 aastate vegetatsiooniperioodi keskmine

## **2. MATERJAL JA METOODIKA**

### **2.1. Andmete ja materjali kogumine**

Käesolevas töös kasutatakse Peipsi järve ja Võrtsjärve hüdrobioloogilise ja -keemilise seire käigus kogutud andmeid aastatest 2011-2016. Kasutatakse vegetatsiooniperioodi (mai-okt) andmestikku. Võrtsjärve ja Peipsi järve proovivõtukohtade kaardid on toodud lisades 1 ja 2 (. Seireandmestiku põhjal analüüsitakse vee füüsikalise-keemiliste näitajate ja mikroskoopeerimise teel hinnatud sinivetikate liigilise koosseisu ning biomassi seoseid molekulaarsete meetoditega saadud potentsiaalselt toksiliste sinivetikate arvukusega.

Seirekordade ajal koguti EMÜ hüdrobioloogia ja kalanduse õppetooli töötajate poolt proovid ka potentsiaalselt toksiliste sinivetikate tuvastamiseks ja arvukuse hindamiseks. Proovid koguti kord kuus vegetatsiooniperioodil Võrtsjärve seirepunktist nr 10 ning Peipsi järve seirepunktidest 2, 4, 11, 38, 16 ja 17. Peipsi järve erinevate osade võrdlemiseks koguti proovid Eesti-Vene ühisekspeditsioonide käigus augustis aastatel 2011-2013.

Proovid koguti kaheliitrise batomeetriga, integreerituna erinevatest sügavustest ning transporditi esimesel võimalusel laborisse. Laboris filtreeriti 50-1500 ml vett läbi 5 µm pooriläbimõõduga polükarbonaatfiltritele (Whatman Cyclopore Polycarbonate). Filtreeritud vee kogus sõltus proovivõtu kohast ja ajast. Filtrid külmutati ning säilitati -80°C kraadi juures kuni edasiste analüüsideni.

Töös on kasutusel andmed aastatest 2011-2016, Võrtsjärvest kokku 36 proovi ja Peipsi järvest 237 proovi.

### **2.2. Potentsiaalselt toksiliste sinivetikate analüüs molekulaarsete meetoditega**

#### **2.2.1. DNA eraldamine**

Molekulaarseteks analüüsideks kogutud proovidest eraldati DNA DNeasy PowerWater Kit-i (QIAGEN®) kasutades vastavalt tootjapoolsetele soovitudele. DNA kontsentratsiooni ja

kvaliteedi määramiseks kasutati NanoDrop™ UV-Vis spektrofotomeetrit (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### 2.2.2. Polümeraasi ahelrekatsiooni metoodika

**PCR metoodika.** Reagentide segu valmistamisel kasutati ultrapuhast mQ vett, 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load (Solis Biodyne, Tartu, Eesti) reaktsioonisegu, praimereid ja proovi DNA-d.

Mikrotsüstiine produtseerivate perekondade *Dolichospermum*, *Microcystis*, ja *Planktothrix* tuvastamiseks kasutati perekonnaspetsiifilisi praimereid vastavalt mcyE-12R, mcyE-R8 (Vaitomaa *et al.*, 2003) ja mcyE-plaR1 (Vaitomaa *et al.*, 2003, Rantala-Ylinen, 2006). Kõikides reaktsioonisegudes kasutati päripidise praimerina mcyE-F2. Anatoksiini tootva perekonna *Dolichospermum* tuvastamisel kasutati praimeripaari anaC-anabF ja anaC-anabR (Suurnäkki *et al.*, in prep.).

20 µl reaktsioonisegu ühe proovi kohta sisaldas 2 µl sihtmärk DNA-d, 0,8 µl mõlemat praimerit (10 µM), 4 µl 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load (Solis Biodyne, Tartu, Eesti) ensüümisegu ja 13,4 µl mQ vett.

Analüüsis kasutati negatiivse kontrollproovi jaoks DNA asemel mQ vett ning positiivsete kontrollproovide jaoks puhaskultuuris kasvatatud perekondade *Microcystis* 205, *Dolichospermum* 315, *Planktothrix* 49 (mikrotsüstiini tootvad perekonnad) ja *Dolichospermum* 37 (anatoksiini tootev perekond) standard DNA-d. Standardkultuurid on pärit Helsinki Ülikooli kultuurikollektsioonist HAMBI.

PCR teostati masinaga Techne® Prime G Thermal Cycler, kus kasutati mikrotsüstiini tootvate perekondade tuvastamiseks programmi, mis on toodud tabelis 2 ning anatoksiini tootvate perekondade tuvastamiseks programmi, mis on toodud tabelis 3.



**Tabel 2:** PCR programm mikrotsüstiini tootvate perekondade tuvastamisel.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
DNA algdenaturatsioon	95 °C	3 min	1
DNA denaturatsioon	94 °C	30 sek	
Praimerite seondumine	56 °C*      58 °C**	30 sek	35
DNA ahela süntees	72 °C	1 min	
Lõppsüntees	72 °C	10 min	1

\* mcyE-R8; \* \*mcyE-R12, mcyE-R1

**Tabel 3:** PCR programm anatoksiini tootvate perekondade tuvastamisel.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
DNA algdenaturatsioon	94 °C	3 min	1
DNA denaturatsioon	94 °C	30 sek	
Praimerite seondumine	59 °C	30 sek	35
DNA ahela süntees	72 °C	1 min	
Lõppsüntees	72 °C	10 min	1

PCR produkte kontrolliti geelelektroforeesi abil, 1,5% agarosgeelil 0.5% TAE puhvril. Geeli valmistamisel kasutati 0,5x TAE puhvrit ning TopVision Agarose tablette (Thermo Scientific™). Geeli voolutamiseks kasutati Cleaver Scientific horisontaalset elektroforeesisüsteemi (Cleaver Scientific, UK). DNA markeerimiseks lisati geelile etiidiumbromiidi (0,5 µg/ml) ning suurusmarkerina kasutati 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne, Tartu, Eesti). Produktid visualiseeriti UV valguse abil, kasutades Quantum ST5 Hood elektroforeesigeelide visualiseerimis- ja dokumenteerimis-süsteemi (Vilber Lourmat, Prantsusmaa).

**QPCR metoodika.** Reaal-aja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR) viidi läbi ESCO Swift™ Spectrum 96 Real Time Thermal Cyclers (ESCO, Singapur) masinaga kasutades programme, mis on toodud alljärgnevates tabelites 4 – 7.

**Tabel 4:** QPCR programm *Microcystis* perekonnas *McyE* geeni tuvastamisel.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	15 min	1
Denaturatsioon	95 °C	15 sek	
Praimerite seondumine ja elongatsioon	62 °C	1 min	40
Sulamiskõvera etapp	95 °C; 60 °C; 95 °C	15 s; 60 s; 15 s	1

**Tabel 5:** QPCR programm *Dolichospermum* perekonnas *McyE* geeni tuvastamisel.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	15 min	1
Denaturatsioon	95 °C	15 sek	
Praimerite seondumine ja elongatsioon	62 °C	1 min	45

**Tabel 6:** QPCR programm *Planktothrix* perekonnas *McyB* geeni tuvastamisel.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	15 min	1
Denaturatsioon	95 °C	15 sek	
Praimerite seondumine ja elongatsioon	60 °C	1 min	40

**Tabel 7:** QPCR programm *Dolichospermum* perekonnas *AnaC* geeni tuvastamisel.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	15 min	1
Denaturatsioon	95 °C	10 sek	
Praimerite seondumine ja elongatsioon	60 °C	45 sek	40
Sulamiskõvera etapp	95 °C; 58 °C; 95 °C	15 s; 30 s; 15 s	1

Reaal-aja kvantitatiivseks qPCR analüüsiks kasutati 5x Hot firePol qPCR MasterMixi (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), mQ vett, praimereid ja proovi DNA 10x lahjendusi.

*McyE* geeni tuvastamisel perekondade *Microcystis* ja *Dolichospermum* puhul kasutati mittespetsiifilist kaheaheelalise DNA-ga seonduvat EvaGreen® värvi sisaldavat ensüümisegu 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis Biodyne, Tartu, Eesti). *McyB* geeni tuvastamiseks perekonnast *Planktothrix* ning *AnaC* geeni tuvastamiseks perekonnast *Dolichospermum* kasutati järjestusspetsiifilist TaqMan® tehnoloogiat ensüümiseguga 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis Biodyne, Tartu, Eesti). Mittespetsiifilise reaktsioonikeemia kasutamisel järgnes qPCR programmile sulamiskõvera analüüs, mille abil hinnati praimerite seondumise spetsiifilisust.

qPCR reaktsioon viidi läbi 20 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 4 µl 5x qPCR mixi, 0,6 µl mõlemat praimerit (10 µM), 9,8 µl mQ vett ja 5 µl sihtmärk DNA 10x lahjendust. TaqMan® tehnoloogia puhul kasutati lisaks praimeritele 0,8 µl (5 µM) spetsiifilise järeustusega fluorestsentsmärgisega sonde ja sellele vastavalt vähem mQ vett. Toksilitse genotüüpide arvukuse hindamiskes kasutatud perekonnaspetsiifilised praimerid on toodud tabelis 8.

Proovid pipeteeriti 96-augulisele plaadile kolmes korduses. Saadud tulemusi analüüsiti võrdleva Ct meetodi abil. Kindla DNA kontsentratsiooniga puhaskultuurist tehti kaliiberlahus, kus oli teada täpne märklaudgeeni koopiate arv mikrolitri kohta (Vaitomaa *et al.*, 2003 järgi). Standardkõvera tegemiseks valmistati kaliiberlahusest 10x lahjendused, mida kasutati võrdleva Ct analüüsi tarbeks. Standardkõvera tegemiseks kasutati puhaskultuure *Microcystis* 205, *Dolichospermum* 315, *Planktothrix* 49 ning *Dolichospermum* 37. QPCR tulemuste arvutamiseks kasutati tarkvara ESCO Spectrum PC Software (ESCO, Singapur).

**Tabel 8:** Töös kasutatud qPCR praimerid.

	Päripidi praimer	Äraspidi praimer	TaqMan® sond	Allikas
<i>Microcystis mcyE</i>	127F	247R	-	Sipari <i>et al.</i> , 2010
<i>Dolichospermum mcyE</i>	611F	737R	672P	Sipari <i>et al.</i> , 2010
<i>Planktothrix mcyB</i>	mcyBA1 fwd	mcyBA1 rev	PLAmcyB	Ostermaier and Kurmayer (2009)
<i>Dolichospermum anaC</i>	anaC-anabF2	anaC- anabR2	-	Suurnäkki <i>et al.</i> , in prep

## 2.3. Statistilised analüüsid

Andmete võrdlemiseks ja analüüsimiseks koostati ühtne andmebaas programmis Microsoft® Excel 2016. Statistilisteks analüüsideks kasutati programmi TIBCO Statistica™. Keskkonnafaktorite mõju toksiinigeenide esinemisele vaadeldi Pearsoni korrelatsiooni analüüsiga. Kuna keskkonnaproovide parameetritel esineb palju erineid ja andmete esialgsel analüüsil selgus, et normaaljaotused puuduvad, on edasises töös korrelatsioonanalüüsid (*scatterplot*) tehtud logaritmitud andmetega.

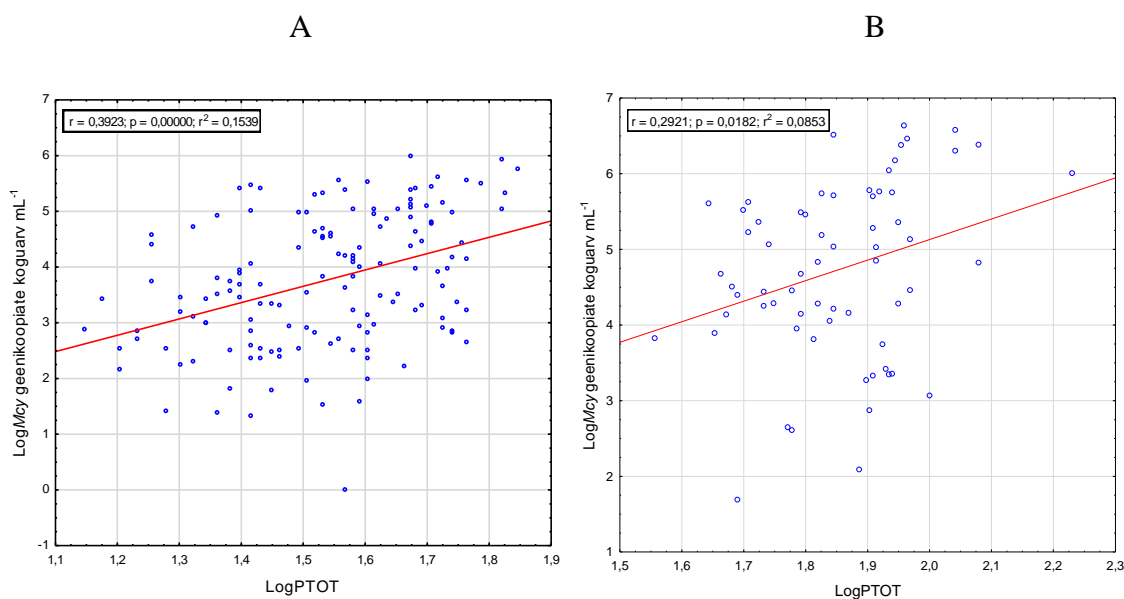
### 3. TULEMUSED

#### 3.1. Peipsi järv

Statistilistel analüüsidel on Peipsi järve kolme osa (Peipsi Suurjärv, Lämmijärv ja Pihkva järv) käsitletud eraldi, kuna tegemist on omavahel selgesti eristatavate järveosadega.

##### 3.1.1. Toiteainete mõju toksiliste sinivetikate esinemisele

Toiteainetest enim mõjutas maksamürki, mikrotsüstiini, tootvate sinivetikate esinemist Peipsi Suurjärves (N= 159) ja Lämmijärves (N= 66) üldfosfori (PTOT) kontsentratsioon (joonis 6).



**Joonis 6:** Üldfosfori kontsentratsiooni mõju maksamürki kodeeriva geeni *Mcy* geenikoopiate koguarvule Peipsi Suurjärves (A) ning Lämmijärves (B).

Lämmastiksisaldus aga niivõrd suurt mõju *Mcy* geenikoopiate koguarvule ei näita. Üldlämmastiku (NTOT) kontsentratsiooni mõju *Mcy* geenikoopiate koguarvule statistiliselt olulist mõju ei avaldanud, seda nii Peipsi järves ega ka Lämmijärves ( $p > 0,05$ ). Lämmastikuühenditest leiti mõlemas järveosas nõrk negatiivne seos ammoniumlämmastiku ning *Mcy* geenikoopiate koguarvu vahel (Suurjärves:  $p < 0,005$ ;  $R = -0,222$ ;  $R^2 = 0,05$ , Lämmijärves:  $p < 0,05$ ;  $R = -0,257$ ;  $R^2 = 0,066$ ). Ka nitraatidega leiti keskmise tugevusega

negatiivne korrelatsioon *Mcy* geenikoopiate koguarvuga (Suurjärves:  $p < 0.0001$ ;  $R = -0,459$ ;  $R^2 = 0,210$ , Lämmijärves:  $p < 0,0001$ ;  $R = -0,424$ ;  $R^2 = 0,18$ ).

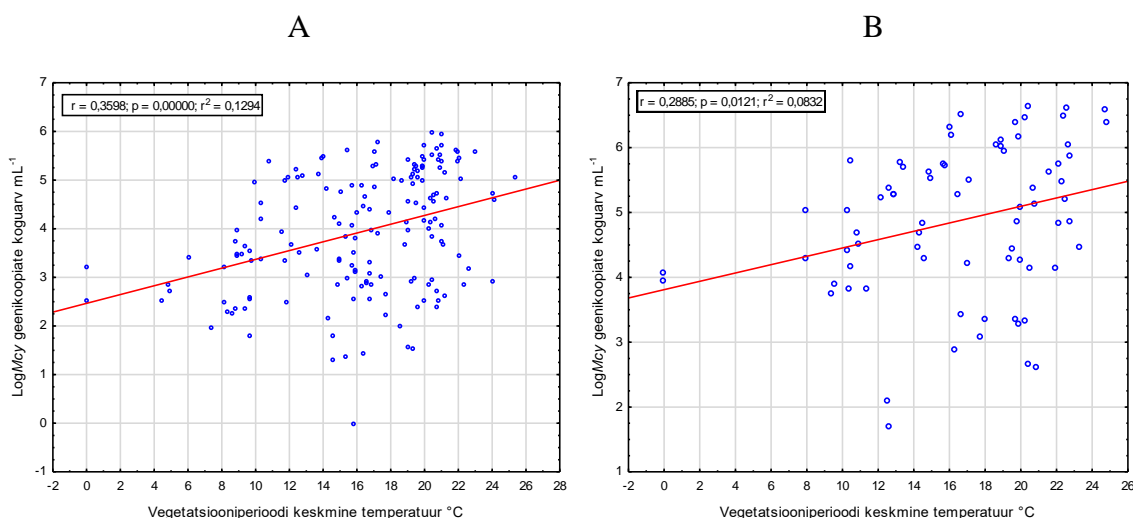
Anatoksiini kodeeriva *AnaC* geenikoopiate koguarvu seos üldfosforiga on samuti statistiliselt oluline Suurjärves ( $p < 0,0001$ ;  $R = 0,334$ ;  $R^2 = 0,111$ ) kuid Lämmijärves on seos nõrgem ( $p < 0,05$ ;  $R = 0,262$ ;  $R^2 = 0,069$ ).

Üldlämmastiku kontsentratsiooni korrelatsioon *AnaC* geenikoopiate koguarvuga on statistiliselt oluline Peipsi Suurjärves, kus ilmnes nõrk negatiivne seos ( $N = 159$ ;  $p < 0,01$ ;  $R = -0,223$ ;  $R^2 = 0,05$ ), Lämmijärves statistiliselt olulist seost ei ilmnenud ( $p > 0,3$ ). Lämmastikuühenditest nitraatide kontsentratsiooni korrelatsioon *AnaC* geenikoopiate koguarvuga on statistiliselt oluline Suurjärves ( $p < 0,005$ ;  $R = -0,265$ ;  $R^2 = 0,07$ ), Lämmijärves korrelatsioon ei ilmne ( $N = 66$ ;  $p > 0,3$ ). Korrelatsioon ammooniumlämmastiku kontsentratsiooni ning *AnaC* geenikoopiate koguarvu vahel ei ole statistiliselt oluline kummaski järveosas (Suurjärves  $p > 0,3$  ja Lämmijärves  $p > 0,8$ ).

Analüüsi ka N:P suhte seost toksiliste genotüüpide esinemisega kuid olulist seost ei leitud.

### 3.1.2. Temperatuuri mõju toksiliste sinivetikate esinemisele

Statistiliselt oluline korrelatsioon vegetatsiooniperioodi keskmise temperatuuri ja mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geenikoopiate koguarvu vahel ilmnes nii Suurjärves ( $N = 159$ ) kui Lämmijärves ( $N = 66$ ) (joonis 7).

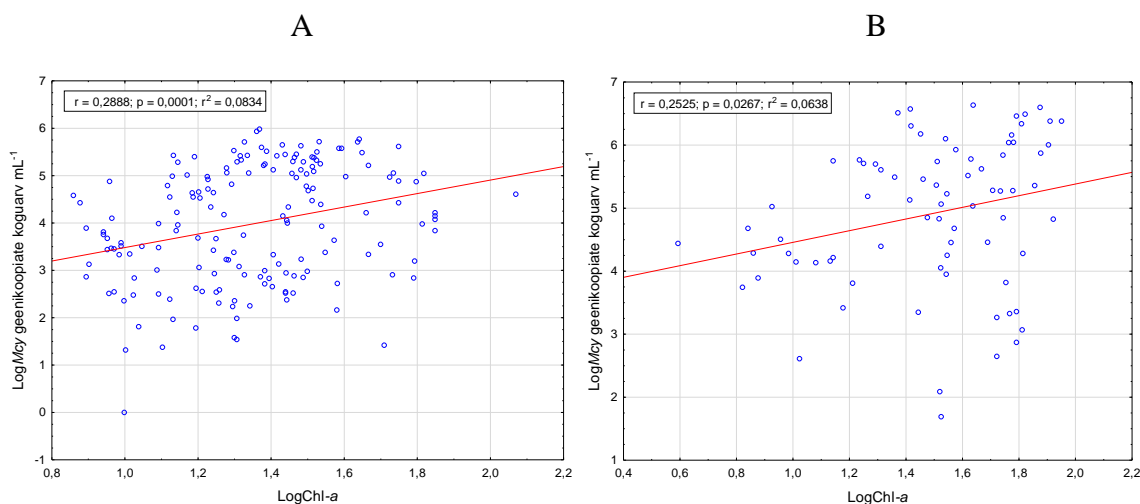


**Joonis 7:** Vegetatsiooniperioodi keskmise temperatuuri mõju maksamürki kodeeriva geeni *Mcy* geenikoopiate koguarvule Peipsi Suurjärves (A) ning Lämmijärves (B).

Samuti esineb mõju vegetatsiooniperioodi keskmisel veetemperatuuril anatoksiini kodeeriva geeni *AnaC* geenikoopiate koguarvule Suurjärves ( $N = 159$ ;  $p < 0,005$ ;  $R = 0,247$ ;  $R^2 = 0,061$ ) kuid Lämmijärves statistiliselt oluline seos puudub ( $N = 66$ ;  $p > 0,1$ ).

### 3.1.3. Klorofüllü sisalduse seos toksiinigeeni koopiate koguarvuga

Vetikate hulk veekogus (väljendatud Chl-*a* sisaldusena) on korrelatsioonis maksamürki kodeeriva *Mcy* geenikoopiate koguarvuga. Tulemustes ilmnes statistiliselt oluline korrelatsioon klorofüllü kontsentratsiooni ja maksamürki kodeeriva *Mcy* geenikoopiate koguarvu vahel nii Suurjärves ( $N=159$ ;) kui Lämmijärves ( $N=66$ ) (joonis 8).

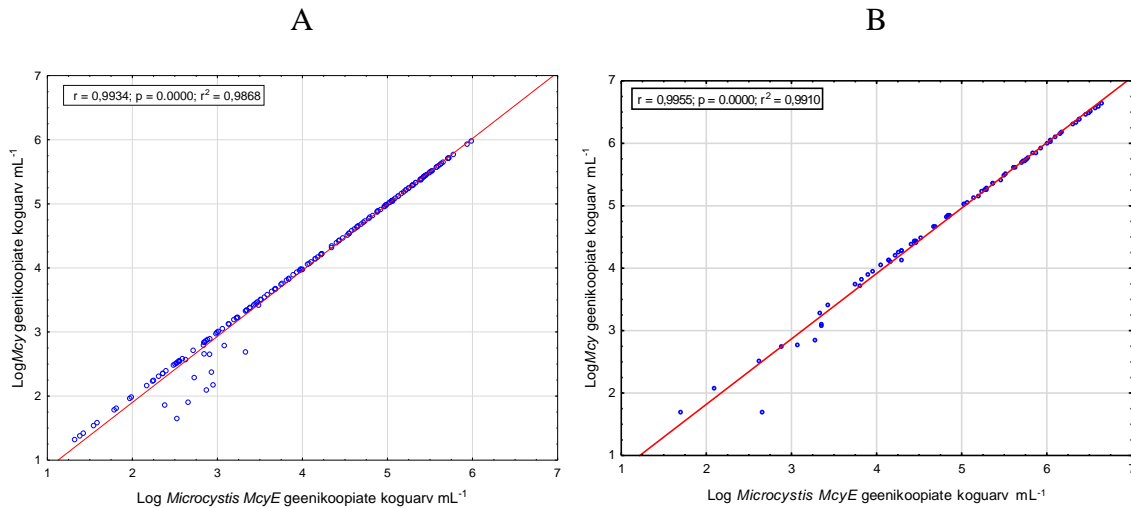


**Joonis 8:** Klorofüllü (Chl-*a*) kontsentratsiooni mõju maksamürki kodeeriva geeni *Mcy* geenikoopiate koguarvule Peipsi Suurjärves (A) ning Lämmijärves (B).

Klorofüllü kontsentratsioon on statistiliselt oluline ka anatoksiini kodeeriva *AnaC* geenikoopiate koguarvule Suurjärves ( $N=159$ ;  $p < 0,0001$ ;  $R = 0,349$ ;  $R^2 = 0,122$ ), kuid Lämmijärves seos ei ilmnenud ( $N=66$ ;  $p > 0,3$ ).

### 3.1.4. Toksiliste genotüüpide esinemine potentsiaalselt toksiliste sinivetikate perekondades

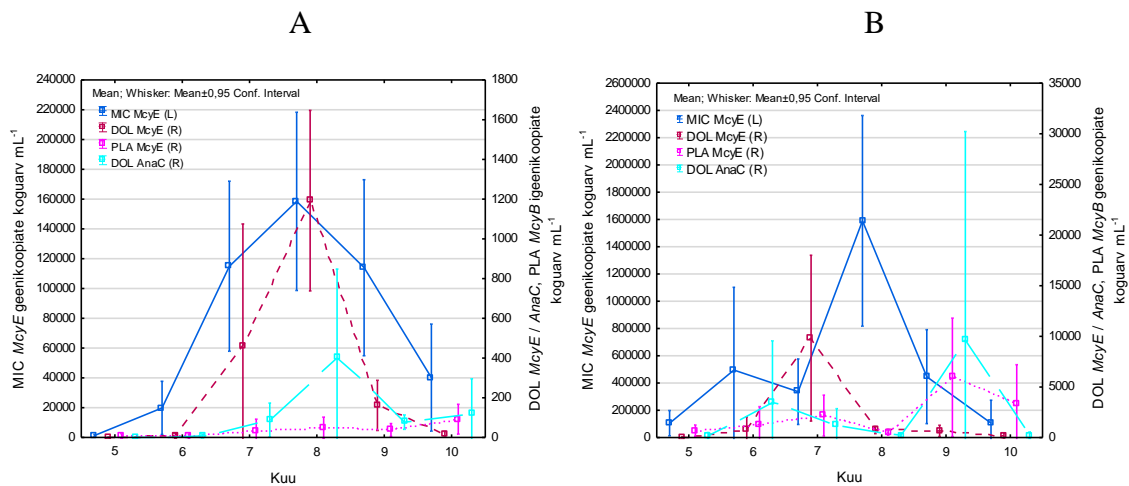
Töös uuritud mikrotsüstiini tootvatest perekondadest *Microcystis*, *Dolichospermum* ning *Planktothrix* on olulisim *Mcy* geenikoopiate koguarvu moodustumisel perekond *Microcystis*, seda nii Suurjärves ( $N=159$ ) kui Lämmijärves ( $N=66$ ) (joonis 9).



**Joonis 9:** Mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geeni koopiate koguarvu sõltuvus perekonnas *Microcystis* esinevast *McyE* geenikoopiate koguarvust Peipsi järves (A) ning Lämmijärves (B).

Samuti mängivad olulist rolli *Mcy* geenikoopiate koguarvu moodustamisel perekonna *Dolichospermum* *McyE* geenikoopiate koguarv (Suurjärves: N=159;  $p < 0.0001$ ;  $R = 0,536$ ;  $R^2 = 0,287$ , Lämmijärves: N=66;  $p < 0,005$ ;  $R = 0,343$ ;  $R^2 = 0,117$ ) ning perekonna *Planktothrix* *McyB* geenikoopiate koguarv (Suurjärves: N=159;  $p < 0,0001$ ;  $R = 0,393$ ;  $R^2 = 0,154$ , Lämmijärves: N=66;  $p < 0,0001$ ;  $R = 0,566$ ;  $R^2 = 0,32$ ). Ometi on eelnimetatud seoste olulisus märgatavalt nõrgem kui perekonnas *Microcystis*.

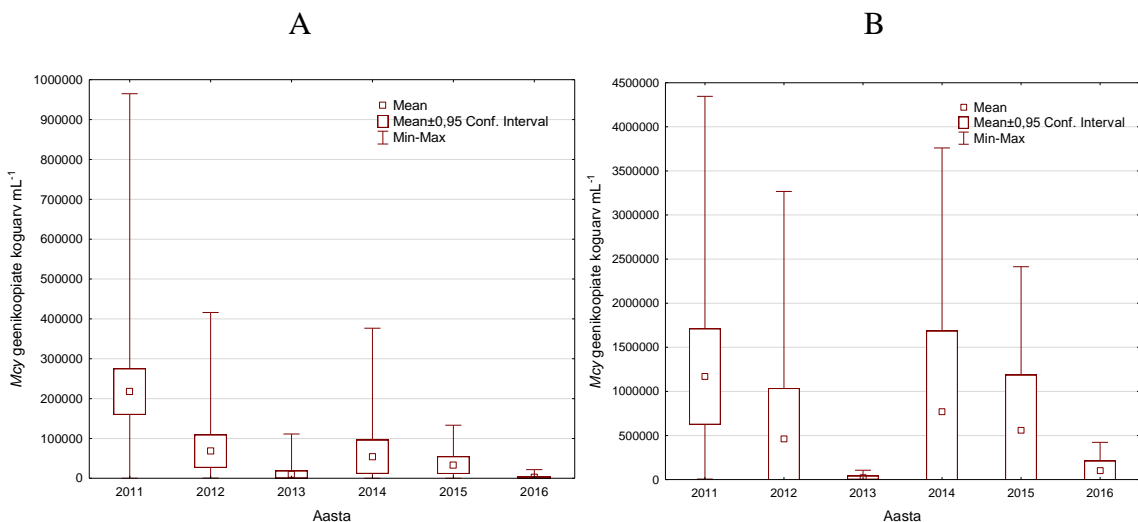
Uuritud perekondades esinevate toksiliste genotüüpide koguarvu moodustamisel omab märkimisväärset rolli perekonna *Microcystis* *McyE* geenikoopiate koguarv (Suurjärves: N=159;  $p < 0.0001$ ;  $R = 0,993$ ;  $R^2 = 0,987$  ja Lämmijärves: N=66;  $p < 0.0001$ ;  $R = 0,981$ ;  $R^2 = 0,962$ ), statistiliselt olulised on samuti perekonna *Dolichospermum* *McyE* geenikoopiate koguarv (Suurjärves: N=159;  $p < 0.0001$ ;  $R = 0,536$ ;  $R^2 = 0,287$  ning Lämmijärves: N=66;  $p < 0,005$ ;  $R = 0,316$ ;  $R^2 = 0,10$ ) ning perekond *Planktothrtix* *McyB* geenikoopiate koguarv (Suurjärves: N=159;  $p < 0,0001$ ;  $R = 0,393$ ;  $R^2 = 0,154$  ja Lämmijäves: N=66;  $p < 0,0001$ ;  $R = 0,539$ ;  $R^2 = 0,29$ ) (joonis 10). Lisaks mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geeni koopiate koguarvule on toksiliste genotüüpide koguarvu moodustumisel statistiliselt oluline ka närvimürgi, anatoksiini, *AnaC* geenikoopiate koguarv, seda nii Suurjärves (N=159;  $p < 0.0001$ ;  $R = 0,562$ ;  $R^2 = 0,316$ ) kui Lämmijärves (N=66;  $p < 0,005$ ;  $R = 0,359$ ;  $R^2 = 0,129$ ).



**Joonis 10:** Uuritud perekondades esinevate toksiliste genotüüpide koguarvu varieeruvus vegetatsiooniperioodil Peipsi Suurjärves (A) ning Lämmijärves (B).

### 3.1.5. Toksiliste sinivetikate esinemise sesoonsed ja aastatevahelised iseärasused

Mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geenikoopiate koguarv varieerus suuresti läbi uuritud aastate nii Suurjärves kui Lämmijärves (joonis 11). Mõlema järveosa puhul on märgata toksiliste tüvede esinemises madalseis aastatel 2013 ja 2016, mis võib olla tingitud ebasoodsatest ilmastikutingimustest.



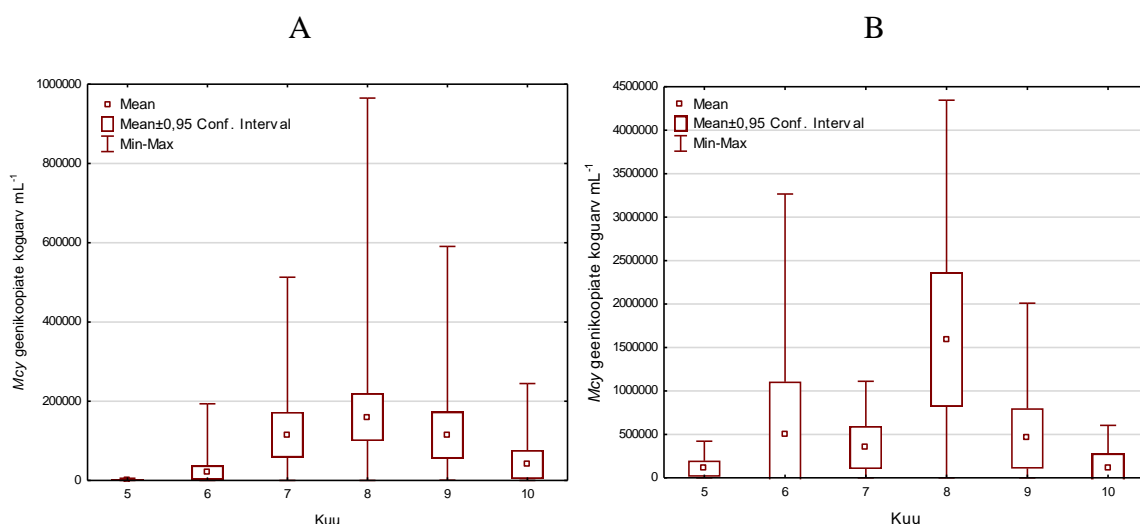
**Joonis 11:** Mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geenikoopiate koguarvu varieeruvus aastati Peipsi Suurjärves (A) ning Lämmijärves (B).

Peipsi Suurjärves on kõrgeim *Mcy* geenikoopiate arv aastal 2011 (keskmiselt 217556 *Mcy* geenikoopiat) ning madalaim aastal 2016 (keskmiselt 2912 *Mcy* geenikoopiat). Lämmijärves



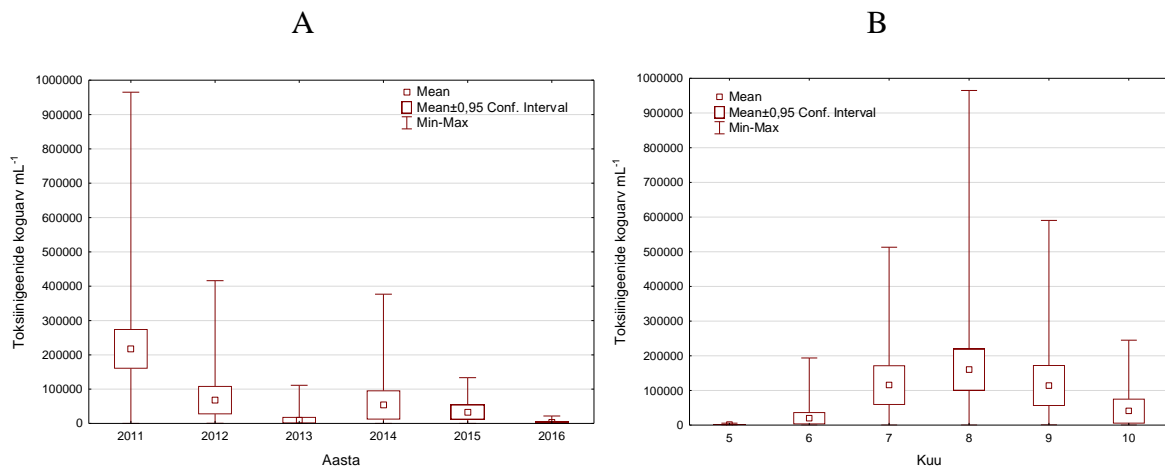
on näha üldiselt suuremaid toksiliste tüvede esinemisväärtusi võrreldes Suurjärvega. Lämmijärves analüüsitud suurimad väärtused olid aastatel 2011 (keskmiselt 1168230 *Mcy* geenikoopiat proovis) ning 2014 (keskmiselt 772409 *Mcy* geenikoopiat proovis). Madalaim toksiliste tüvede esinemine oli Lämmijärves aastal 2013 (keskmiselt 21888 *Mcy* geenikoopiat proovis).

Vegetatsiooniperioodi kuude kaupa vaadeldes selgus, et Suurjärves toimub *Mcy* geenikoopiate koguarvu tõus kasvuperioodil ühtlaselt, saavutades maksimumi augustis (joonis 12, A). Lämmijärves jääb samuti selge toksiliste tüvede esinemise maksimum augusti- kuusse, kus keskmine *Mcy* geenikoopiate arv on 1591450 proovis. Lisaks jääb silma ka juunikuu, kus keskmine *Mcy* geenikoopiate arv on 497270 proovis, mis ületab mai, juuli, septembri ja oktoobri tasemeid. Madalaim *Mcy* geenikoopiate arv oli maikuu (106385, joonis 12, B).



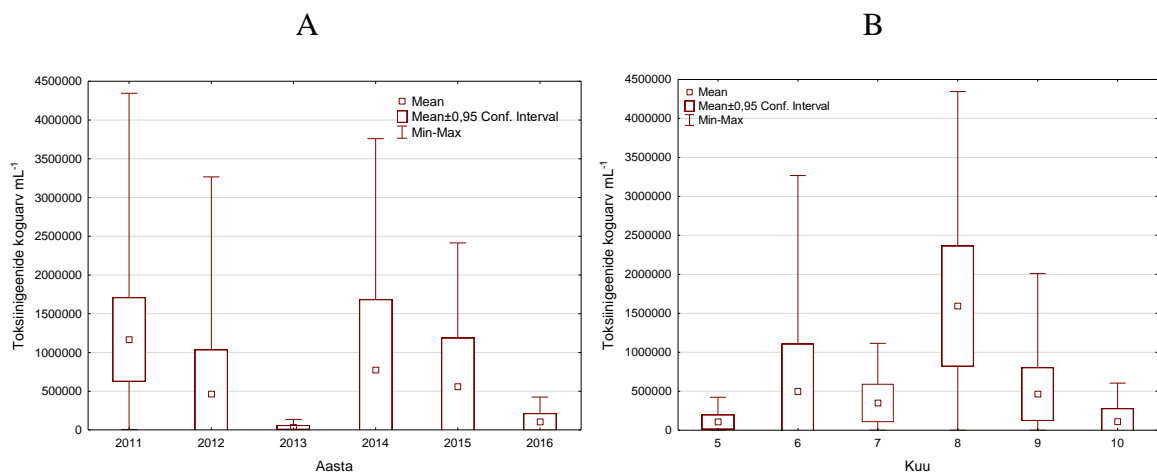
**Joonis 12:** Mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geenikoopiate koguarvu varieeruvus vegetatsiooniperioodil (mai – oktoober) Peipsi Suurjärves (A) ning Lämmijärves (B).

Kuna analüüsitud proovides mikrotsüstiini *Mcy* geenikoopiate arv moodustab lõviosa kogu toksiliste tüvedest, on ka kogu toksiinigeenide arvukus Suurjärves suurim aastal 2011 (keskmiselt 217556 geenikoopiat proovis) ning madalaim aastal 2016 (keskmiselt 2919, joonis 13, A). Vegetatsiooniperioodil Suurjärves on samuti toksiinigeenide koguarvu maksimum augustikuus, kus geenikoopiate keskmine arvukus on 159792 (joonis 13, B) .



**Joonis 13:** Toksiinigeenide (mikrotsüstiini *Mcy* ja anatoksiini *AnaC* geenikoopiate) koguarvu varieeruvus Peipsi Suurjärves uuritud aastatel (A) ning vegetatsiooniperioodil (B).

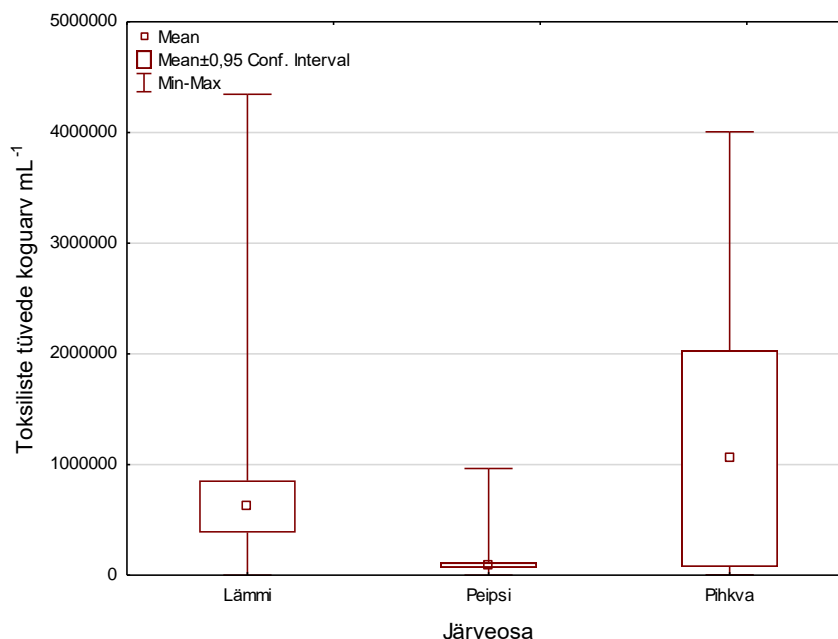
Nii nagu Suurjärveski moodustab suure osa ka Lämmijärves kogu toksiinigeenide arvukusest *Mcy* geenikoopiate koguarv. Toksiinigeenide arvukus Lämmijärves oli suurim aastatel 2011 (keskmiselt 1168230 geenikoopiat proovis) ning 2014 (keskmiselt 772555). Aastal 2013 aga oli see madalaim, keskmiselt 33301 geenikoopiat proovi kohta (joonis 14, A). Samuti on toksiinigeenide koguarv vegetatsiooniperioodil kõrgeim augustikuus (keskmiselt 1591990 geenikoopiat proovis), madalaim aga maikuus, keskmiselt 106537 (joonis 14, B).



**Joonis 14:** Toksiinigeenide (mikrotsüstiini *Mcy* ja anatoksiini *AnaC* geenikoopiate) koguarvu varieeruvus Lämmijärves uuritud aastatel (A) ning vegetatsiooniperioodil (B).

Lisaks Suurjärvele ning Lämmijärvele on ühisekspeditsiooni käigus augustikuudel kogutud proovid ka Pihkva järvest. Kuna toksiliste tüvede arvukuse maksimumid on esinenud nii Suurjärves kui Lämmijärves augustikuus, on sobiv neid võrrelda ka Pihkva järvest samal

ajal kogutud proovidega. Kogu toksiliste tüvede arvukuse augustikuised maksimumid kolmes järveosas on aga väga erinevad (joonis 15).

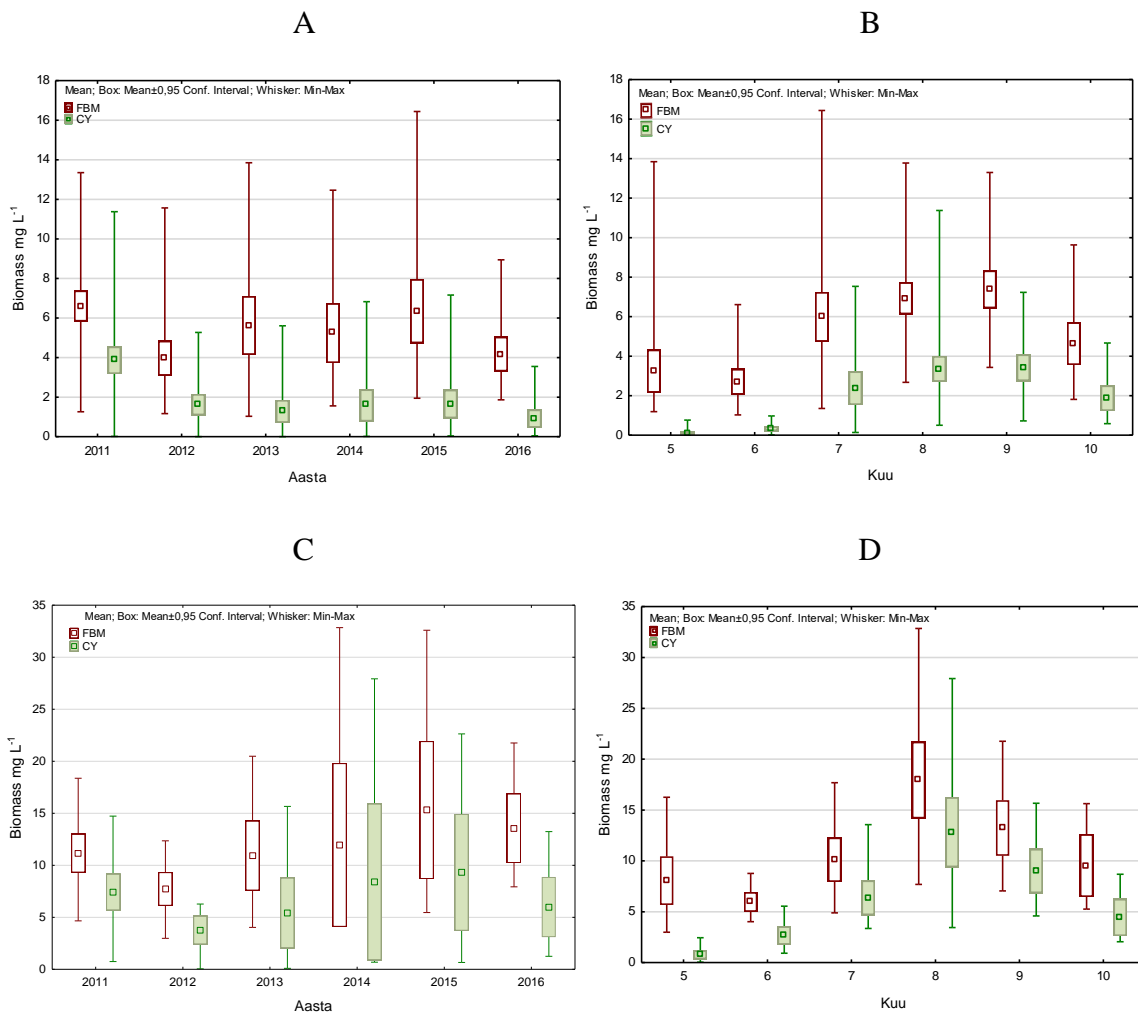


**Joonis 15:** Toksiliste genotüüpide arvukus augustikuisel maksimumil kolmes järveosas.

Peipsi Suurjärves on toksiliste genotüüpide arvukus augustikuisel maksimumil kolmest järveosast kõige madalam (keskmiselt 91643 geenikoopiat proovis). Pihkva järves on see aga selgelt suurim (keskmiselt 1053070 geenikoopiat proovis). Lämmijärves on toksiliste genotüüpide arvukus augustikuisel maksimumil keskmiselt 620923 geenikoopiat proovis.

### 3.1.6. Võrdlus traditsiooniliselt kasutatavate meetodite tulemuste ja molekulaarsete meetodite tulemuste vahel potentsiaalselt toksiliste sinivetikate esinemisel

Traditsiooniliselt kasutatava mikroskopeerimise andmete statistilisel analüüsimisel selgus, et kasvuperioodil olulise osa kogu fütoplanktoni biomassist (FBM) moodustas sinivetikate biomass (CY) peamiselt Lämmijärves (joonis 16).



**Joonis 16:** Fütoplanktoni biomassi ja sinivetikate biomassi varieeruvus aastati ning vegetatsiooniperioodil Peipsi Suurjärves (A; B) ja Lämmijärves (C; D)

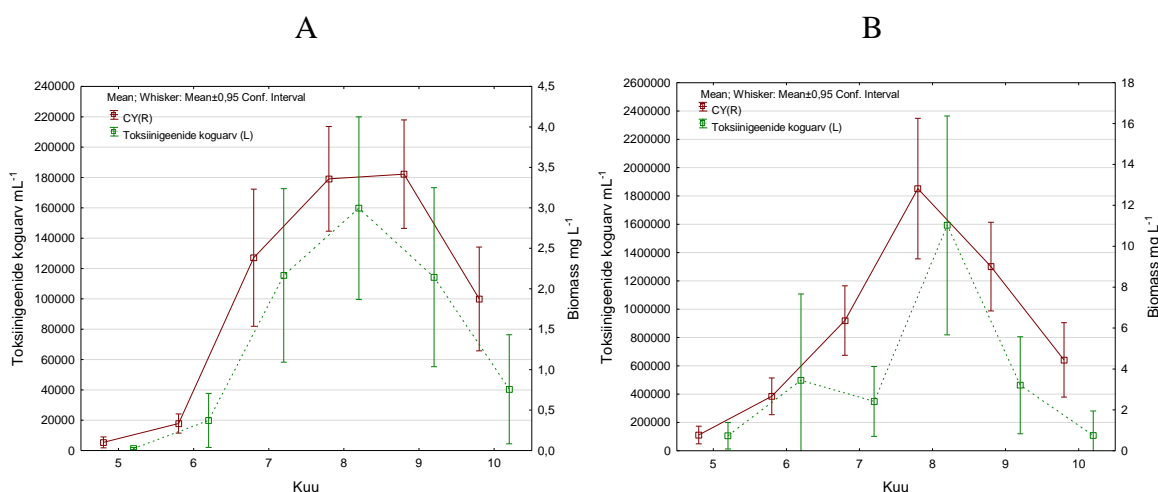
Peipsi Suurjärves oli fütoplanktoni biomassi maksimum aastatel 2011 ja 2015, vastavalt 6,6 g/m<sup>3</sup> ja 6,3 g/m<sup>3</sup>, millest sinivetikad moodustasid 57,6% ja 25,4%. Madalaim oli FBM aastal 2012 - 3,9 g/m<sup>3</sup>, sinivetikaid 41%.

Kasvuperioodil oli fütoplanktoni biomassi maksimum augustikuus, keskmiselt 7,4 g/m<sup>3</sup>, millest moodustas sinivetikate biomass 46%. Madalaimad väärtused saadi mais ja juunis. Mais oli fütoplanktoni keskmine biomass 3,2 g/m<sup>3</sup>, millest sinivetikad moodustasid vaid 3%; juunis olid need väärtused 2,7 g/m<sup>3</sup> ja 11%.

Lämmijärves oli kogu fütoplanktoni maksimum aastatel 2014 ja 2015. 2014. aasta fütoplanktoni keskmiseks mõõdeti 11,9 g/m<sup>3</sup>, millest sinivetikad moodustasid 70,6%. 2015. aastal olid need väärtused 15,3 g/m<sup>3</sup> ja 61%. Madalaim oli FBM aastal 2012 - 7,7 g/m<sup>3</sup>, millest sinivetikad moodustasid 48%.

Kasvuperioodil oli fütoplanktoni biomassi maksimum augustikuus, keskmiselt 17,9 g/m<sup>3</sup>, millest moodustasid sinivetikad 72%. Madalaimad väärtused esinesid mais (8 g/m<sup>3</sup>, sinivetikaid 8,8%) ja juunis (5,9 g/m<sup>3</sup>, sinivetikaid 44% ).

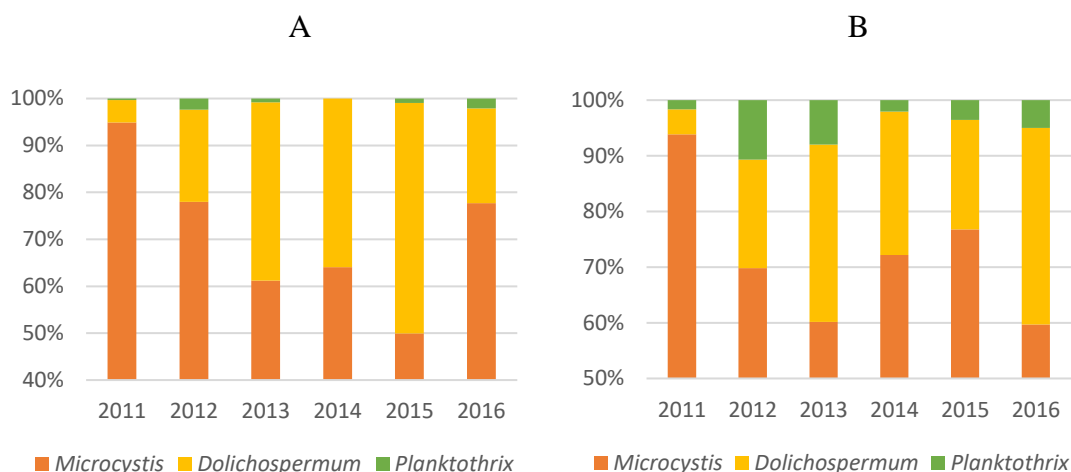
Peipsi Suurjärves on omavahel statistiliselt tugevalt seotud sinivetikate biomass ning toksiliste genotüüpide arvukus ( $p < 0.0001$ ;  $R = 0,661$ ;  $R^2 = 0,437$ ). Olenemata mõnevõrra nõrgemast seosest on ka Lämmijärves sinivetikate biomassi ja toksiliste genotüüpide omavaheline korrelatsioon tugev ( $p < 0,0005$ ;  $R = 0,465$ ;  $R^2 = 0,216$ ) (joonis 17).



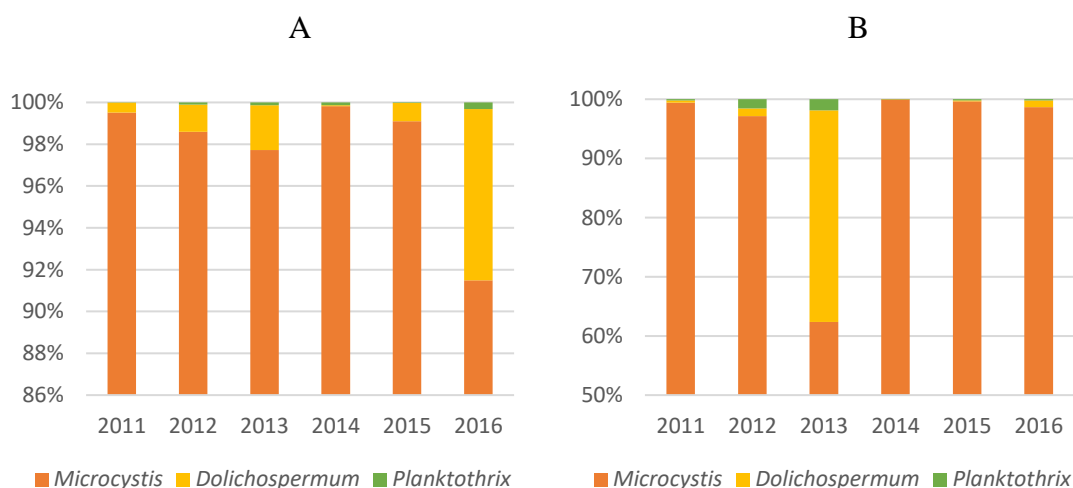
**Joonis 17:** Sinivetikate biomassi ja tuvastatud toksiliste genotüüpide arvukuse varieeruvus vegetatsiooniperioodil Peipsi Suurjärves (A) ning Lämmijärves (B).

Domineerivaks perekonnaks sinivetikate biomassis mikroskoopilisel vaatlusel oli *Microcystis* nii Suurjärves kui Lämmijärves (joonis 18). Perekond *Planktothrix* moodustas äärmiselt väikese osa uuritud perekondade kogu biomassist.

Molekulaarsete meetoditega toksiliste tüvede tuvastamisel selgus, et samuti domineerivaks nii Suurjärves kui Lämmijärves on perekond *Microcystis* (joonis 19).



**Joonis 18:** Potentsiaalselt toksiliste perekondade *Microcystis*, *Dolichospermum* ja *Planktothrix* tuvastamine mikroskoopilise meetodiga uuritud aastate vältel Peipsi Suurjärves (A) ja Lämmijärves (B).

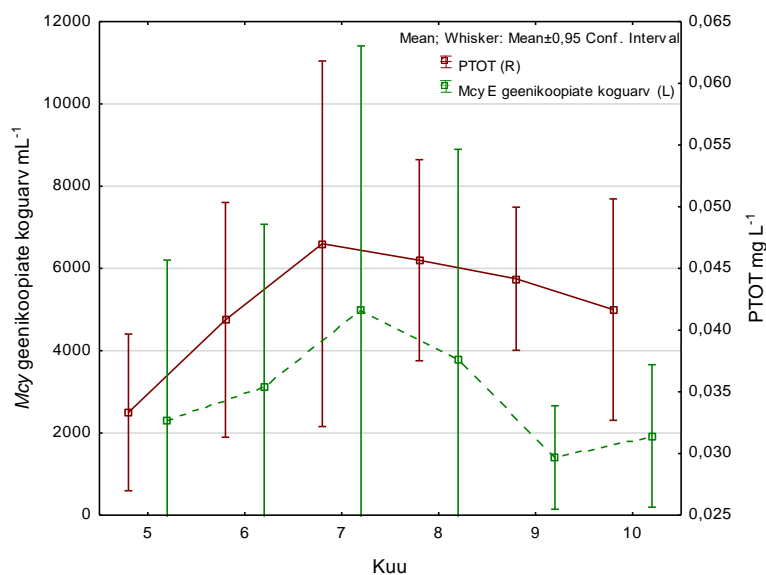


**Joonis 19:** Perekondades *Microcystis*, *Dolichospermum* ja *Planktothrix* toksiliste tüvede tuvastamine molekulaarsete meetoditega uuritud aastate vältel Peipsi Suurjärves (A) ja Lämmijärves (B).

## 3.2. Võrtsjärv

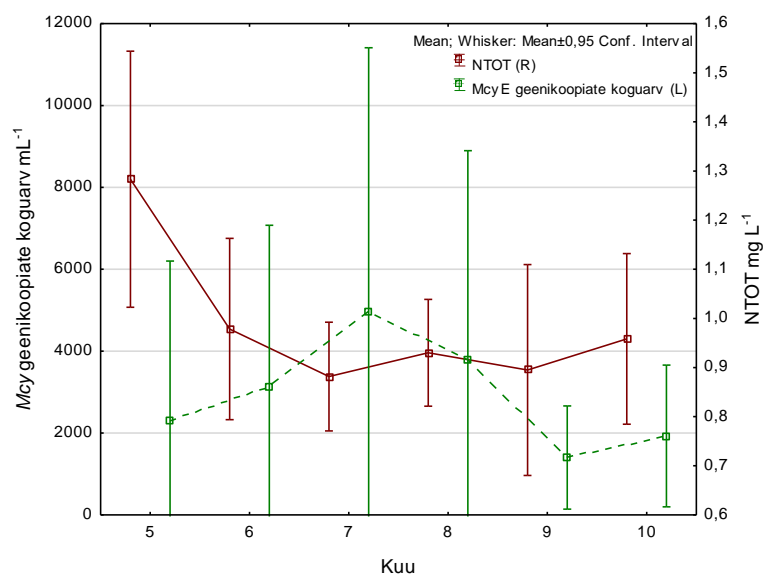
### 3.2.1. Toiteainete mõju toksiliste sinivetikate esinemisele

Uuritud toiteainete mõju toksiliste genotüüpide esinemisele statistilisel analüüsil ei avastatud ( $N=36$ , PTOT:  $p > 0,6$ , NTOT:  $p > 0,7$ ). Analüüsiti ka N:P suhte seost toksiliste genotüüpide esinemisega kuid seost ei leitud. Sellest olenemata on joonisel 20 näha, et toksiliste genotüüpide koguarvu kasv ning langus käib paralleelselt üldfosfori sisaldusega, kuigi seda väikese viibega.



**Joonis 20:** Üldfosfori (PTOT mg L<sup>-1</sup>) kontsentratsiooni ja mikrotsüstiini kodeerivate geenide *Mcy* koopiate koguarvu varieeruvus vegetatsiooniperioodil Võrtsjärves.

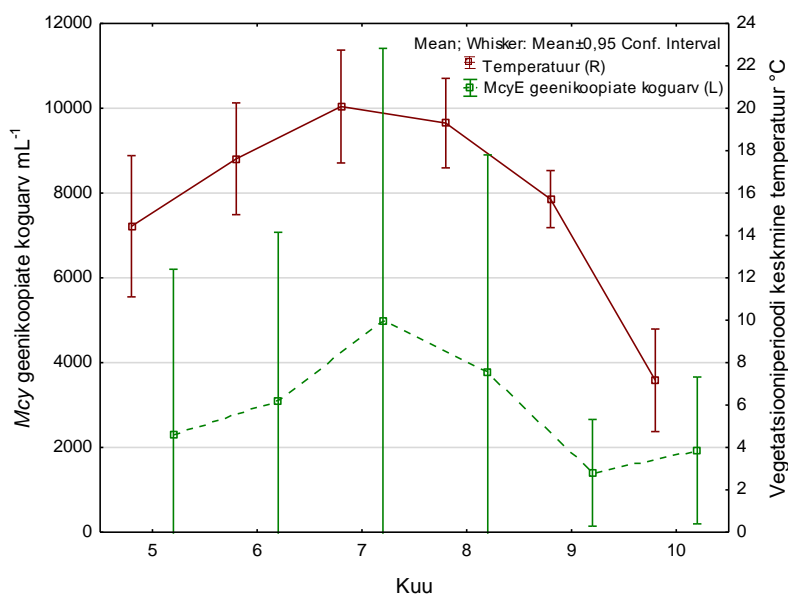
Üldlämmastiku ja toksiliste genotüüpide esinemise vahel aga ilmneb siiski nõrk vastupidine dünaamika: joonisel 21 on näha, et vegetatsiooniperioodil üldlämmastiku kontsentratsiooni alanedes tõuseb toksiliste genotüüpide arvukus ning üldlämmastiku kontsentratsiooni tõustes geenikoopiate arvukus langeb. Ka ammoniumlämmastikuga ega nitraatidega statistiliselt olulist seost ei tuvastatud ( $p$  vastavalt 0,14 ja 0,84).



**Joonis 21:** Üldlämmastiku (NTOT mg L<sup>-1</sup>) kontsentratsiooni ja mikrotsüstiini kodeeriva geeni *Mcy* koopiate koguarvu varieeruvus vegetatsiooniperioodil Võrtsjärves.

### 3.2.2. Veetemperatuuri mõju toksiliste sinivetikate esinemisele

Võrtsjärves uuritud aastatel vegetatsiooniperioodil toksiliste genotüüpide esinemine ja temperatuuri vahel statistiliselt olulist seost ei tuvastatud. Joonisel 22 on toodud temperatuuri ja toksiliste genotüüpide koguarvukuse varieeruvus. Joonisest tulenevalt võib väita, et temperatuur on siiski oluliseks faktoriks toksiliste sinivetikate esinemisel, sest temperatuuri tõustes on näha ka geenikoopiate koguarvu kasvu.

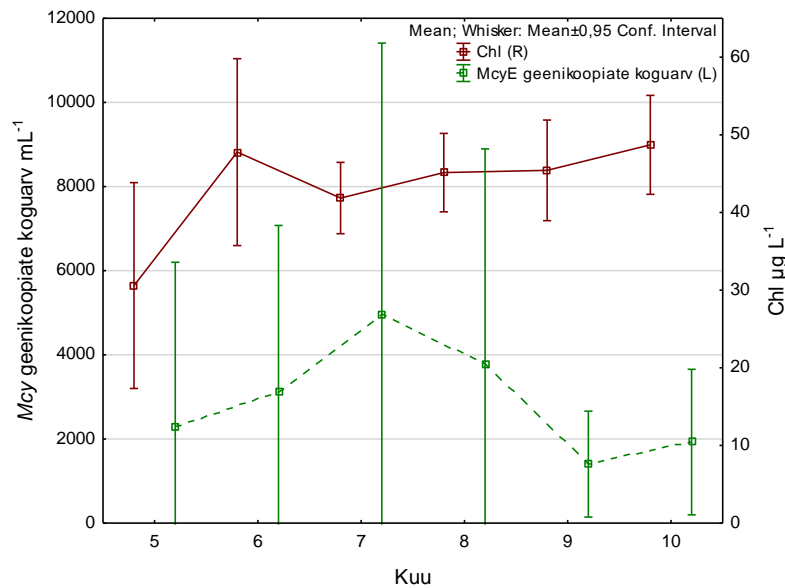


**Joonis 22:** Temperatuuri ja toksiliste genotüüpide koguarvukuse varieeruvus vegetatsiooniperioodil Võrtsjärves.

### 3.2.3. Klorofüllis sisalduse seos toksiinigeenide koopiate koguarvuga

Klorofüllis sisalduse ja toksiliste genotüüpide vahel samuti statistiliselt oluline seos puudus ( $p > 0,9$ ). Lisaks ka vegetatsiooniperioodil mõõdetud klorofüllis sisalduse varieeruvuse ja toksiliste genotüüpide arvukuse vahel silmnähtavat seost ei ilmnenud (joonis 23).



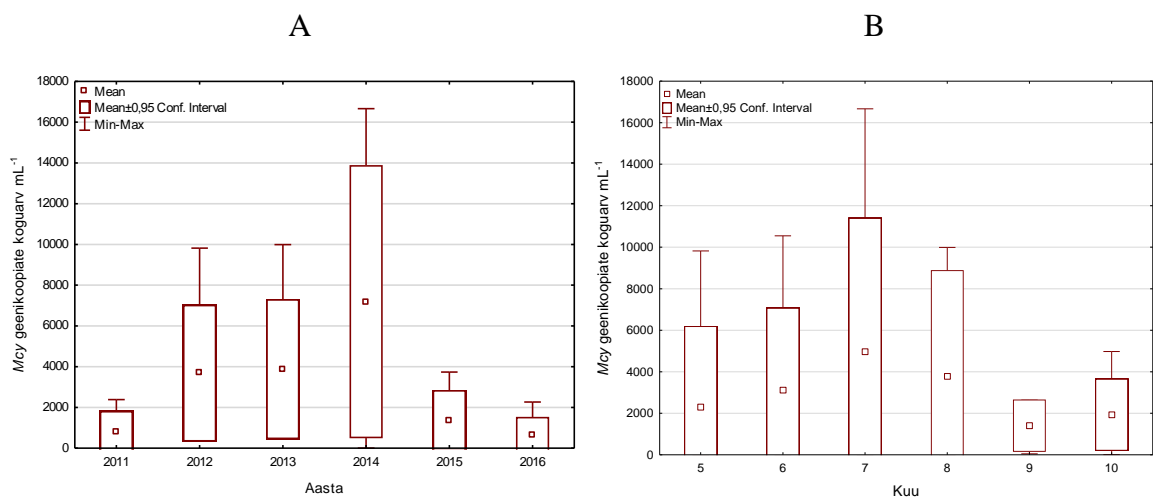


**Joonis 23:** Klorofüllisalduse ja toksiliste genotüüpide koguarvukuse varieeruvus vegetatsiooniperioodil Võrtsjärves.

### 3.2.4. Toksiliste sinivetikate esinemise sesoonsed ja aastatevahelised iseärasused

Võrtsjärves moodustus toksiliste genotüüpide koguarvukus potentsiaalsete mikrotsüstiini tootvate perekondade *Microcystis* ja *Planktothrix* *Mcy* geenikoopiate koguarvust. Perekonnas *Dolichospermum* ei tuvastatud ei *McyE* geeni ega *AnaC* geeni.

Kõige suurem *Mcy* geenikoopiate arv oli aastal 2014 (keskmiselt 7192 geenikoopiat proovis) ning madalaim aastal 2016 (keskmiselt 605, joonis 24, A). Võrtsjärves oli vegetatsiooniperioodil toksiliste genotüüpide arvukus maist kuni augustini üsna sarnane, varieerudes keskmiselt 2296-4973 *Mcy* geenikoopiat proovi kohta. Toksiliste genotüüpide maksimum esines juulikuus, keskmiselt 4973 *Mcy* geenikoopiat proovis (joonis 24, B). Septembris aga langes toksiliste genotüüpide arvukus drastiliselt, keskmiselt 1400 *Mcy* geenikoopiani proovi kohta.

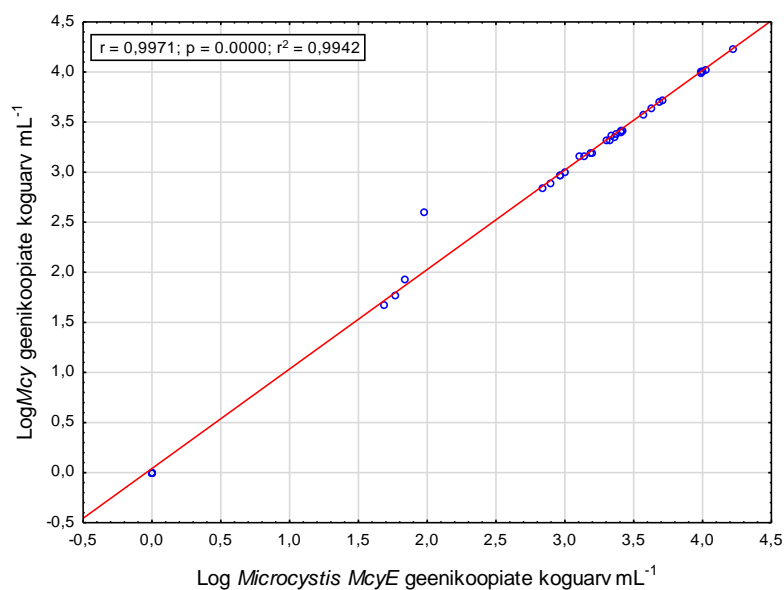


**Joonis 24:** Mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geenikoopiate koguarvu varieeruvus Võrtsjärves aastati (A) ning vegetatsiooniperioodil (mai-oktoober) (B).

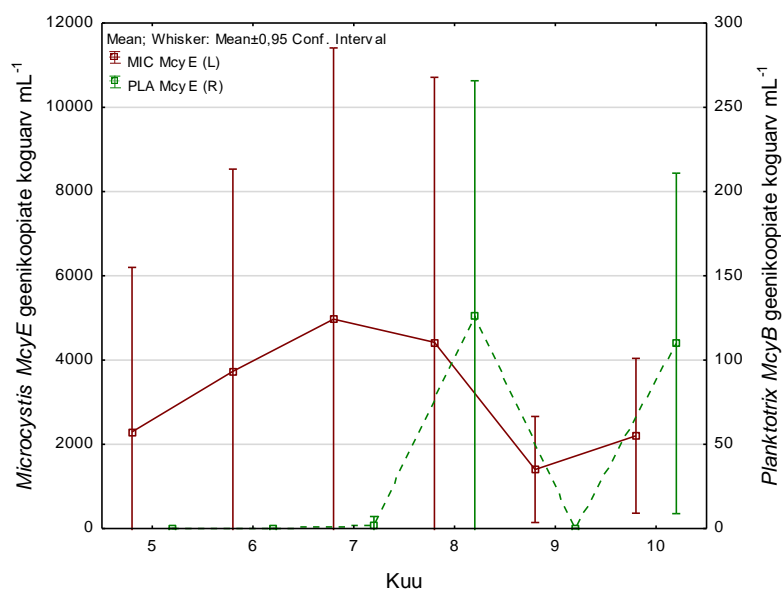
### 3.2.5. Toksiliste genotüüpide esinemine potentsiaalselt toksiliste sinivetikate perekondades

Nii nagu Peipsi Suurjärve ja Lämmijärve puhul, tuvastati ka Võrtsjärves enim toksilisi genotüüpe perekonnas *Microcystis* (N=36) (joonis 25). Perekonnas *Planktothrix* tuvastatud toksiliste genotüüpide arvukus kogu toksiliste genotüüpide arvukust statistiliselt oluliselt ei mõjutanud ( $p > 0,09$ ). Perekonnas *Dolichospermum* ei tuvastatud ühtegi toksilist genotüüpi, seda nii *McyE* geeni tuvastamisel ega ka anatoksiini kodeeriva geeni *AnaC* tuvastamisel. Seega tuvastati Võrtsjärves vaid potentsiaalsed mikrotsüstiini tootvad toksilised genotüübid.

Kogu vegetatsiooniperioodi vältel on toksiliste genotüüpide koguarvukuses domineerivaks perekonnas *Microcystis* tuvastatud *McyE* geenikoopiate koguarv. Kasvuperioodi lõpus, augustis ja oktoobris, aga tuvastati ka perekonnas *Planktothrix* *McyB* geenikoopiate maksimumid. Sellegipoolest jäävad need tunduvalt madalamale tasemele võrreldes perekonnas *Microcystis* tuvastatud *McyE* geenikoopiate koguarvule (joonis 26).



**Joonis 25:** Mikrotsüstiini kodeeriva geeni *Mcy* koopiate koguarvu sõltuvus perekonnas *Microcystis* tuvastatud *McyE* geenikoopiate koguarvust Võrtsjärves.

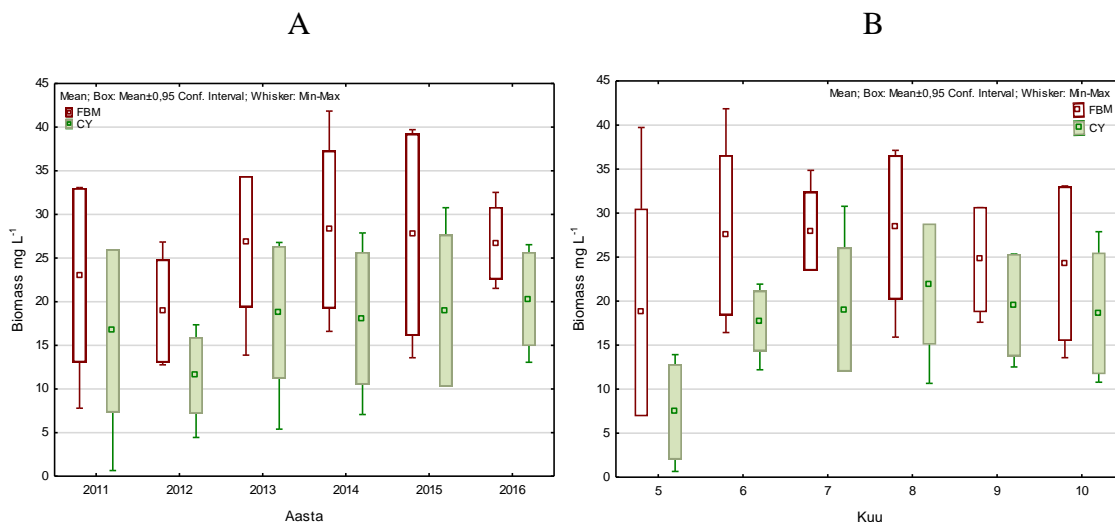


**Joonis 26:** Perekonnas *Microcystis* ja *Planktothrix* vegetatsiooniperioodil tuvastatud *Mcy* geenikoopiate koguarvu varieeruvus.

### 3.2.6. Võrdlus traditsiooniliselt kasutatavate meetodite tulemuste ja molekulaarsete meetodite tulemuste vahel potentsiaalselt toksiliste sinivetikate esinemisel

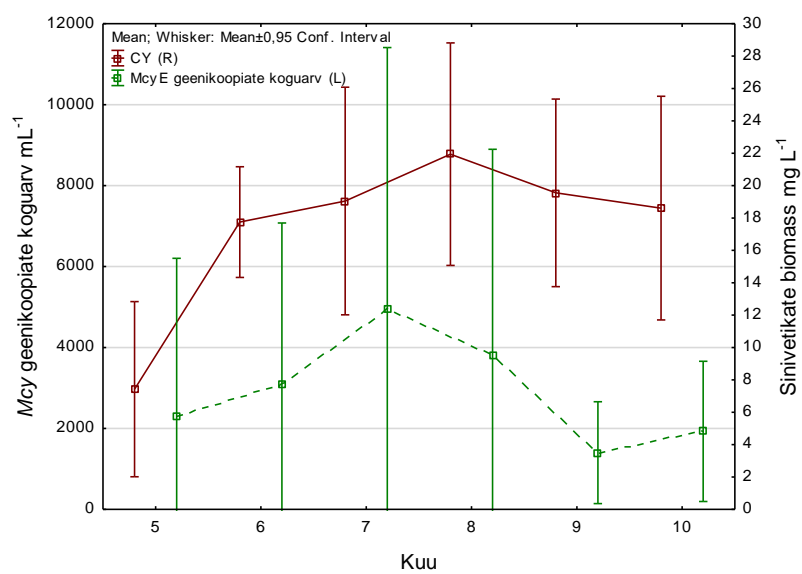
Traditsiooniliselt kasutatavate mikroskopeerimise andmete statistilisel analüüsimisel selgus, et kasvuperioodil märkimisväärse osa kogu fütoplanktoni biomassist moodustas sinivetikate biomass kõigil uuritud aastatel (joonis 27). Kõrgeimad biomassi maksimumid olid aastatel 2014, kus keskmisest fütoplanktoni biomassist 28 g/m<sup>3</sup> moodustasid sinivetikad 64% ja 2015, kus samad näitajad olid 27 g/m<sup>3</sup> ja 70%. Madalaimad mõõdetud biomassid olid aastal 2012, kus keskmine fütoplanktoni biomass oli 19 g/m<sup>3</sup>, sellest sinivetikaid 58%.

Vegetatsiooniperioodil olid fütoplanktoni biomassi maksimumid juunis (keskmiselt 27 g/m<sup>3</sup>, sellest sinivetikaid 63%) ja augustis (28 g/m<sup>3</sup>, sinivetikaid 75%).



**Joonis 27:** Kogu fütoplanktoni biomassi ning sinivetikate biomassi varieeruvus aastati (A) ning vegetatsiooniperioodil mai-oktoober (B).

Sinivetikate biomassi ja toksiliste genotüüpide arvukuse omavahelise seose analüüsimisel statistiliselt olulist korrelatsiooni ei tuvastatud ( $p > 0,6$ ). Vaadeldes aga nende varieerumist vegetatsiooniperioodil, võib väita, et nad on omavahel seotud (joonis 28). Sinivetikate biomassi tõustes tõuseb mõnevõrra hiljem ka toksiliste genotüüpide koguarv.



**Joonis 28:** Sinivetikate biomassi ja tuvastatud toksiliste genotüüpide arvukuse varieeruvus vegetatsiooniperioodil.

## **4. ARUTELU**

### **4.1. Ilmastiku mõju vegetatsiooniperioodil toksiliste sinivetikate esinemisele**

Läbiviidud uuringust selgus, et ilmastik avaldab mõju vegetatsiooniperioodil fütoplanktoni, sealhulgas sinivetikate, biomassi koguarvule. Sellest tulenevalt on ka toksiliste sinivetikate arvukus mõjutatud kevadisest jääminekust ning sügisesest veetemperatuuri langusest.

Peipsi järves täheldati toksiliste genotüüpide arvukuse miinimumid aastatel 2013 ja 2016. 2013. aasta vegetatsiooniperioodi algus oli eriline. Talv oli väga pikk, jääminek toimus alles mai algul ning kevad oli erakordselt lühike, ööpäevane keskmine temperatuur saavutas suvise taseme juba mai keskel. Ilmselt on see ka põhjuseks kõrvalekalletele vetikarühmade fenoloogias, sest 2013. aastal olid läbi vegetatsiooniperioodi selges ülekaalus ränivetikad. Augustis, kus enamasti domineerivad sinivetikad, oli aastal 2013 hoopis ränivetikate biomassi maksimum. Vegetatsiooniperioodi lõpul ületasid ränivetikad küll dominantide hulgas selgelt sinivetikaid, kuid viimaste biomassi langus tõi kaasa ka kogu biomassi järsu languse (Peipsi järve ..., 2014).

Vegetatsiooniperioodi esimene pool oli 2016. aastal jahe, ka suvekuudel oli veetemperatuur pikaajalisest keskmisest madalam. Peipsi järves oli 2016. aastal sinivetikate biomassi maksimum alles septembris, kuid nende biomass oli samas varasemate aastate maksimumidest tunduvalt madalam. Augustikuus, kus tavaliselt on dominantideks sinivetikad, väärib ka sel aastal tähelepanu ränivetikate domineerimine, ning seda ka kogu kasvuperioodi vältel. Lisaks toimus oktoobris mõlemas järveosas nii sini- kui ränivetikate tugev biomassi langus (Peipsi järve..., 2017).

Võrtsjärve ökosüsteem on järve suure pindala ja väikese sügavuse tõttu väga tugevasti füüsikaliste tegurite poolt juhitud. Jääkatte vaheldumine jäävaba perioodiga ja suured veetaseme muutused on peamised tegurid, mis kujundavad Võrtsjärves keemiliste ja bioloogiliste näitajate sesoonset käiku. 2014. aasta pehme talve ning suurveetipu puudumise tõttu võis ilmned a vegetatsiooniperioodil toksiliste sinivetikate esinemise maksimum uuritud aastate vältel (Võrtsjärve ..., 2015).

## 4.2. Toksiliste sinivetikate esinemine sõltub järve iseloomust

Peipsi järve kolm osa on omavahel selgesti eristatavad. Suurjärv oli kuni möödunud sajandi keskpaigani mõõdukalt eutroofne, põhjaosa isegi mesotroofne. Pihkva ja Lämmijärv on omavahel sarnasemad, olles tugevalt eutroofsed järved. Seega nii fütoplanktoni liigiline koosseis kui biomassi dünaamika on järveosades mõnevõrra erinevad. Põhiline erinevus ilmneb just fütoplanktoni hulgas ja liikide arvus, mis on märkimisväärselt suuremad just järve lõunaosas (Laugaste *et al.*, 2008). Rantala *et al.*, (2006) järgi eksisteerivad enamasti eutroofsete järvede õitsengumassis kõik kolm potentsiaalselt toksilist perekonda *Microcystis*, *Planktothrix* ja *Dolichospermum* koos. Ka antud töö tulemused on selle väitega kooskõlas. Toksilised genotüübid nendest perekondadest tuvastati Peipsi järves kogu vegetatsiooniperioodi vältel. Võrtsjärves esines toksilisi tüvesid vaid perekondades *Microcystis* ja *Planktothrix*, mis Rantala *et al.*, (2006) läbiviidud uuringu kohaselt on omane peamiselt mesotroofsetele järvedele. Suurjärves on toksiliste genotüüpide arvukuse augustikuised maksimumid märkimisväärselt madalamad kui Lämmi- ja Pihkva järves. Pihkva järve toksiliste genotüüpide suur arvukus võib olla tingitud nii järve suurusest ja madalast sügavusest kui ka allohtoonsest toiteainete sissekandest Velikaja jõest, mis on suurim Peipsi järve voolav jõgi. Laugaste *et al.*, (2001) järgi on tugevalt eutroofsetes kiiremini soojenevates lõunapoolsetes järveosades sinivetikad ülejäänud fütoplanktonist märkimisväärselt arvukamad ning nende arengu tippaeg on suvel. Lisaks on viimasel aastakümnel lõunapoolsemates järveosades märkimisväärselt tõusnud perekonna *Microcystis* osakaal; seda on ka antud uuringutulemustes selgesti näha, sest > 90% kogu toksiliste tüvede arvukusest moodustas perekonnas *Microcystis* tuvastatud *McyE* geenikoopiate koguarv.

Võrtsjärve fütoplanktonit võib pidada pigem liigivaeseks, sest tooni annavad vaid kaks suurt rühma – ränivetikad ja sinivetikad. Suure osa Võrtsjärve fütoplanktoni biomassist moodustavad tavaliselt paar-kolm liiki. Tsüanobakterite hulgas on kõige arvukam esindaja mitte-toksiline perekond *Limnothrix*, mis moodustab ligi 90% kogu sinivetikate suvisest biomassist (Nõges *et al.*, 2003). Seega on ka ilmne, et toksiliste tüvedega sinivetikaid on võrdlemisi vähe, mida antud töö raames läbiviidud uuring ka kinnitab. Lisaks on Võrtsjärv tuulele üsna avatud ning vesi on pidevalt segatud tuulest tingitud turbulentsist ja seetõttu on vetikarakud jaotunud veesambas ühtlasemalt.

Antud töö tulemustest selgus, et mõlemas uuritud järves tuvastati enim toksilisi genotüüpe perekonnas *Microcystis*. Toksiine kodeerivate geenidekoopiate koguarvud aga erinesid Peipsi järves ja Võrtsjärves märkimisväärselt. Lisaks, uuritud kolmest perekonnast tuvastati Võrtsjärves toksilised genotüübid vaid kahes perekonnas. Seega leidis kinnitust töö kolmas hüpotees, mis väidab, et toksiliste genotüüpide arvukus Peipsi järve erinevates osades ja Võrtsjärves on oluliselt erinev.

### **4.3. Sinivetikate potentsiaalse toksilisuse hindamine**

Vaatamata pikalt kasutuses olnud traditsioonilistele toksiliste sinivetikate arvukuse hindamise viisidele, esineb nende meetodite kasutamisel mitmeid puudusi. Ideaalseks oleks lihtne, kiire meetod, mis poleks ülemäära kulukas ega nõuaks otsest tsüanotoksiinide kontsentratsioonide mõõtmist (Pacheco *et al.*, 2016).

Traditsiooniliselt on Eesti suurjärvede uurimisel kasutatud potentsiaalselt toksiliste sinivetikate biomassi määramist mikroskoobis loendamisel, samuti planktoni üldhulga hindamist peamise fotosünteesipigmenti, Chl-*a*, analüüsil. Ka WHO soovitude kohaselt tuleb jälgida klorofüllü kontsentratsiooni ja tsüanobakterite koguhulka, et kaitsta inimest tsüanotoksiinide kõrgete kontsentratsioonide eest (Chorus & Bartram, 1999). Kuid nii Davis *et al.*, (2009) läbiviidud uuringust kui ka antud tööst ilmnes toksiliste genotüüpide esinemise ning Chl-*a* vahel vaid väga nõrk korrelatsioon. See pole üllatav, kuna kogu fütoplankton sisaldab klorofüllü, sealhulgas ka tsüanobakterite liigid, mis võivad olla nii toksilised kui ka mittetoksilised (Chorus & Bartram, 1999).

Pacheco *et al.*, (2016) järgi on viimaste aastate jooksul qPCR meetod osutunud paljutootavaks vahendiks. Arvukad uuringud toetasid ideed, et qPCR meetod aitaks hinnata kiirelt potentsiaalselt toksilise õitsegu riski juba varajases staadiumis. Ka antud uuringus on kasutatud toksiliste genotüüpide arvukuse hindamiseks qPCR meetodit, millega oli võimalik tuvastada ka toksilisi genotüüpe juba väikeste arvukuste juures. Erinevates uuringutes on leitud positiivne korrelatsioon toksiliste genotüüpide arvukuse ja toksiinikontsentratsiooni vahel (Kurmayer *et al.*, 2003; Pacheco *et al.*, 2016). Selline seos on leitud ka Eesti suurjärvedes (Panksep, avaldamata andmed). Sellest võib eeldada, et qPCR meetod on heaks täienduseks praegu Eesti suurjärvede sinivetikate uurimisel kasutatavatele traditsioonilistele meetoditele, võimaldades anda kiireid hinnanguid toksiliste õitsengute tekkeriskile.



#### 4.4. Füüsikalis-keemiliste parameetrite mõju toksiliste genotüüpide esinemisele

Viimaste kümnendite jooksul on täheldatud toksiliste õitsengute sagenemist, selle peamiseks põhjusteks on kirjanduses toodud veekogude toiteainetega rikastumist ning soojemat temperatuuri (Paerl, 1988; Chorus & Bartram, 1999; Hudnell & Dortch, 2008; Paerl & Huisman, 2008).

Mitmed laboritingimustes tehtud uuringud on näidanud, et mikrotsüstiini tootmine tsüanobakteritel on korrelatsioonis kõrgete lämmastiku ja fosfori kontsentratsioonidega (Sivonen, 1990; Vezie *et al.*, 2002). On küll kindel, et lämmastiku ja fosfori kontsentratsioonid stimuleerivad toksiliste õitsengute teket, kuid ei ole tõendeid, et nende makrotoiteainete sisalduse tõus avaldaks looduses otsest mõju mürgiste ja mittemürgiste genotüüpide avaldumisele (Neilan *et al.*, 2013). Antud töös leiti Peipsi järves korrelatsioon mikrotsüstiini kodeeriva geeni esinemise ja üldfosfori kontsentratsiooni vahel, kuid lämmastiku sisalduse mõju statistiliselt olulisena ei väljendunud kummaski uuritud järves. Seega võib väita, et lämmastiku kontsentratsiooni mõju hepatotoksiliste genotüüpide esinemisele on väiksem kui fosforil, kuid mängib rolli õitsengukoosluse dünaamikas. Silmas tuleb pidada, reeglina eelistavad õitsengut põhjustavad sinivetikad madalat lämmastiku-fosfori suhet (Nõges *et al.*, 2008), mille madalamad väärtused Peipsi lõunapoolsetes järveosades on üheks põhjuseks sealsele suuremale sinivetikate biomassile ja seega ka toksiinide sisaldusele.

Mitmetes uuringutes on ilmnenud seos füüsikalis-keemiliste parameetrite (temperatuur, valguse intensiivsus, lämmastiku kättesaadavus) ja anatoksiini tootmise vahel (Rapala *et al.*, 1993; Gallon *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 2002). Rapala *et al.*, (1993) järgi on anatoksiini tootlus kõrgem madalamatel lämmastiku kontsentratsioonidel, seega on ka toksiliste genotüüpide arvukus eeldatavasti kõrge just lämmastikuvaesel perioodil. Ka antud töö tulemustes ilmnesid statistiliselt olulised negatiivsed korrelatsioonid nii üldlämmastiku kui nitraatide kontsentratsiooni ja *AnaC* geenikoopiate koguarvu vahel Peipsi Suurjärves. Lämmijärves olulisi seoseid nende vahel ei leitud ning Võrtsjärves anatoksiini tootvaid sinivetikaid ei tuvastatud üldse. Rapala ja Sivoneni (1998) järgi on optimaalsetel valgustingimustel anatoksiini tootlus raku kohta kõrge. Võrtsjärves on valguse levik veesambas piiratud veekogu hägususe tõttu (Võrtsjärve..., 2015), see võib olla ka üheks põhjuseks, miks toksilisi genotüüpe potentsiaalses anatoksiini tootvas perekonnas *Dolichospermum* ei leitud.

Magevee ökosüsteemides on vegetatsiooniperioodil veetemperatuur vahemikus 10-30 °C ning enamasti jahedamal perioodil on domineerivaks ränivetikad. Vee soojenedes lisanduvad kooslusesse sinivetikad (Canale & Vogel, 1974; Reynolds, 1997). On täheldatud, et tsüanobakterid domineerivad fütoplanktoni koosluses kõige soojematel perioodidel (Canale & Vogel, 1974; Reynolds & Walsby, 1975; Tilman & Kiesling, 1984; Paerl, 1988; Paerl & Huisman, 2008). Ka antud uuringus domineerisid vegetatsiooniperioodi soojematel kuudel üldiselt tsüanobakterid, eriti perekonnast *Microcystis*. Toksiliste genotüüpide arvukuse maksimumid esinesid Peipsi järve puhul augustikuus ning Võrtsjärves juulis, kus veetemperatuurid küündisid üle 20 °C. Ka varasemas uuringus Peipsi sinivetikate kohta ilmnes, et peakomponentidest mõjutas nende biomassi kõige rohkem temperatuur (33%), millele järgnesid biogeenid (27%), ja kõige tugevam oli nende mõju perekonnale *Microcystis* (Laugaste *et al.*, 2013).

Töös püstitatud teine hüpotees, mis väidab, et toksiliste genotüüpide arvukus Eesti suurjärvedes sõltub eelkõige vee temperatuurist ja toiteainete sisaldusest vees leiab kinnitust. Nii temperatuur kui toiteainete kontsentratsioon mõjutavad oluliselt vegetatsiooniperioodil sinivetikakoosluse dünaamikat. Nagu ka antud uuringutulemused näitavad, siis soodsa veetemperatuuriga ja toiteainete sisaldusega esineb sinivetikakoosluses rohkelt toksiliste genotüüpidega liike.

#### **4.5. Kokkupuuteoht tsüanotoksiinidega Eesti suurjärvedes**

Tsüanobakterid on veekogus tihti muret tekitavad organismid oma võime tõttu toota mitmesuguseid tugevaid toksine, kaasa arvatud hepatotoksine, neurotoksine ja nahka ärritavad ühendeid. On tõendeid, et tsüanotoksiinid on põhjustanud kari- ja koduloomade surma ning ohustavad ka inimeste tervist. Magevees on levinumad maksamürgid, mikrotsüstiinid, mille peamiseks produtseerijaks on perekond *Microcystis* (Chorus & Bartram, 1999). Sinivetikate massesinemist, sealhulgas ka potentsiaalselt toksiliste sinivetikate õitsenguid on Peipsi järves täheldatud juba aastal 1895 (Laugaste *et al.*, 2001). Maailma Terviseorganisatsioon on esitanud joogivees leiduva mikrotsüstiini kontsentratsiooni suunisväärtuseks 1 µg L<sup>-1</sup> (WHO, 1998). See on vajalik hindamaks vee potentsiaalset toksilisust, sest Peipsi järvest välja voolaval Narva jõel asuv veehoidla varustab Narva linna joogiveega. Samuti asub Peipsi järve kaldal rohkelt puhkeotstarbeks

kasutatavaid randasid, kus sobivatel ilmastikutingimustel võib toksiline õitsengumass akumul eeruda.

Antud uuringu tulemustele toetudes võib väita, et perekond *Microcystis* on Peipsi järve erinevates osades ning Võrtsjärves probleemiks, sest just selles perekonnas tuvastati uuritud aastatel kõige suurem *McyE* geenikoopiate arvukus. Seega leidis kinnitust töös püstitatud esimene hüpotees, mis väidab, et Eesti suurjärvedes toodavad maksamürke enim liigid perekonnast *Microcystis*. Ka varasemate uuringute põhjal oli Peipsi järves vegetatsiooniperioodil domineerivaks perekonnaks *Microcystis* (Tanner *et al.*, 2005; Laugaste *et al.*, 2013).

Töös uuritud aastate vältel küündis mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geeni arvukus kohati üle 1000 000 koopia milliliitris. Sellest lähtuvalt võib eeldada, et ka mikrotsüstiini kontsentratsioon Peipsi järves võis olla märkmisväärne, eriti õitsengumassi akumul eerumisel ranna-aladele. Tanner *et al.*, (2005) mõõtsid 2002. aastal Peipsi järve põhjaosa randades mikrotsüstiini koguseid, mis ületasid mitmesaja kordselt WHO sätestatud piirnormi.

## KOKKUVÕTE

Kliimamuutuse ning jätkuva eutrofeerumise tagajärjel on sinivetikate massesinemised saagenud üle kogu Maa. Õitsengut põhjustavate liikide seas võivad esineda ka toksilised tüved. Kuna tsüanotoksiinid võivad kahjustada inimeste ja loomade tervist, on väga oluline tuvastada potentsiaalselt toksiliste sinivetikate olemasolu veekogus, et anda hinnanguid surplus- ja joogivee ohutusele. Tavapäraseks rutiiniks on, et proove analüüsitakse mikroskoobiga ja hinnatakse sinivetikate biomassi ja liigilise koosseisu alusel nende potentsiaalne toksilisus. Kahjuks aga ei ole morfoloogiliste tunnuste alusel võimalik toksilisi ja mittetoksilisi tüvesid teineteisest eristada. Üha enam kasutatakse molekulaarseid meetodeid tuvastamiseks toksiliste tüvede olemasolu veekogus. Meetodid on väga tundlikud ning võimaldavad hinnata riski toksilise õitsengu tekkeks juba varakult.

Töö eesmärgiks on peamiste mikrotsüstiine ja anatoksiine tootvate sinivetikate tuvastamine ja arvukuse hindamine molekulaarsete meetoditega Peipsi järve ja Võrtsjärve 2011-2016 aastate proovidest. Antud töös on keskendutud potentsiaalselt toksiliste sinivetikate perekondadele *Microcystis*, *Dolichospermum* ja *Planktothrix*.

Toiteainetest enim mõjutas mikrotsüstiini tootvate sinivetikate esinemist Peipsi järves üldfosfori kontsentratsioon. Lämmastik aga niivõrd suurt mõju *Mcy* geenikoopiate koguarvule ei omanud. Anatoksiini kodeeriva *AnaC* geenikoopiate koguarvu seos üldfosforiga oli samuti oluline Suurjärves, kuid Lämmijärves oli seos nõrgem. Üldlämmastiku kontsentratsiooni seos *AnaC* geenikoopiate koguarvuga oli statistiliselt oluline Peipsi Suurjärves, kus ilmnes nõrk negatiivne korrelatsioon. Lämmijärves olulist seost ei ilmnenud. Võrtsjärves uuritud aastate vegetatsiooniperioodi vältel toksiliste genotüüpide esinemise ja temperatuuri vahel korrelatsiooni ei tuvastatud. Ka uuritud toiteainete mõju toksiliste genotüüpide esinemisele statistiliselt olulist mõju ei omanud.

On küll kindel, et lämmastiku ja fosfori kontsentratsioonid stimuleerivad toksiliste õitsengute teket, ometi pole tõendeid, et nende makrotoiteainete sisalduse tõus avaldaks looduses otsest mõju mürgiste ja mittemürgiste genotüüpide avaldumisele. Antud töös leiti Peipsi järves korrelatsioon mikrotsüstiini kodeeriva geeni esinemise ja üldfosfori sisalduse vahel, kuid lämmastiku kontsentratsiooni mõju statistiliselt olulisena ei väljendunud

kummaski uuritud järves. Seega võib väita, et lämmastiku sisalduse mõju hepatotoksiliste genotüüpide esinemisele on varjatud, ja mängib rolli õitsegukoosluse dünaamikas.

Peipsi järves mikrotsüstiini tootvatest perekondadest, *Microcystis*, *Dolichospermum* ning *Planktothrix* oli toksiinigeenide koguarvukuse moodustumisel olulisim perekond *Microcystis*. Võrtsjärves moodustus toksiliste genotüüpide koguarvukus perekondade *Microcystis* ja *Planktothrix* *Mcy* geenikoopiate koguarvust. Perekonnas *Dolichospermum* toksilisi tüvesid ei leitud. Nii nagu Peipsi järve ja Lämmijärve puhul, oli ka Võrtsjärves kõige enam toksilisi genotüüpe perekonnas *Microcystis*.

Töös uuritud aastate vältel täheldati märkimisväärsed väärtusi mikrotsüstiini kodeeriva *Mcy* geenikoopiate arvukuses. Kuna varasemad uuringud on näidanud toksiliste genotüüpide ja toksiini kontsentratsiooni vahel tugevat korrelatsiooni, võib eeldada, et ka Peipsi järves võisid uuritud aastate vältel olla toksiinikogused kõrged, eriti õitsengumassi akumulierumisel ranna-aladele. Toksiinigeenide koguarvukus Peipsi Suurjärves oli suurim aastal 2011 ning madalaim aastal 2016. Toksiinigeenide arvukus Lämmijärves oli suurim aastatel 2011 ning 2014. Aastal 2013 aga oli toksiinigeenide arvukus madalaim. Võrtsjärves kõige suurem *McyB/E* geenikoopiate arv oli aastal 2014 ning madalaim aastal 2016.

Läbiviidud uuringust selgus, et ilmastik avaldab mõju vegetatsiooniperioodil fütoplanktoni, sealhulgas sinivetikate hulgale. Sellest tulenevalt võib ka väita, et toksiliste sinivetikate arvukus on mõjutatud kevadisest jääminekust ning veemassi soojenemisest ja sügisest jahtumisest. On täheldatud, et sinivetikate biomassi maksimumid esinevad kõige soojematel perioodidel. Kooskõlas selle ideega domineerisid ka antud uuringus vegetatsiooni perioodi soojematel kuudel üldiselt tsüanobakterid. Toksiliste genotüüpide arvukuse maksimumid esinesid Peipsi järve puhul augustikuus ning Võrtsjärves juulis, kus veetemperatuurid ületasid 20 °C.

## SUMMARY

Due to climate change and eutrophication, the frequency of cyanobacterial blooms is predicted to increase. There are toxic genotypes among bloom-forming genera and cyanotoxins pose a health risk to humans and animals. Therefore, detection of toxic cyanobacteria is very important to evaluate the risk of toxicity of the recreational and drinking water. Traditionally, potentially toxic cyanobacteria are evaluated by cyanobacterial biomass and species composition. As toxic and non-toxic cells are morphologically identical, microscopy cannot be used to differentiate them. Molecular methods have become more common to distinguish toxic genotypes from non-toxic ones. These methods are very sensitive and give an opportunity to evaluate the risk of toxic bloom in an early stage.

The main aim of this study was to detect and quantify hepatotoxin and neurotoxin producing genera in Estonian large lakes using molecular methods. This study was focused on mainly bloom-forming and potentially toxic cyanobacterial genera *Microcystis*, *Planktothrix* and *Dolichospermum*.

In current study, total phosphorus content correlated with the occurrence of potential microcystin-producing cyanobacteria in both parts of the Lake Peipsi (Suurjärv and Lämmijärv). Nitrogen did not have such an effect on the total number of *Mcy* gene copies. The correlation between the total number of *AnaC* gene copies and total phosphorus was also significant in Lake Peipsi but in Lämmijärv, the relationship was weaker. The relation between the total nitrogen concentration and the number of *AnaC* gene copies was statistically significant in Peipsi Suurjärv, where a weak negative correlation was observed, but in Lämmijärv no significant correlation was observed. In Lake Võrtsjärv, statistically significant correlation between the presence of toxic genotypes and temperature during was not observed and the effect of the nutrients on the occurrence of toxic genotypes was not statistically significant as well.

Surely, concentrations of nitrogen and phosphorus stimulate cyanobacterial blooms, but there is no evidence that an increase in their concentrations would have a direct effect on the occurrence of toxic and non-toxic genotypes. The results of this work revealed a weak correlation between the presence of the microcystin-producing gene and the concentration

of total phosphorus in Lake Peipsi, but the effect of nitrogen concentration was not statistically significant in either of the studied lakes. Therefore it seems, that nitrogen concentrations do not necessarily influence the presence of hepatotoxic genotypes in the community.

In Estonian large lakes, most of the toxic genotypes were found in the genus *Microcystis*. In Lake Peipsi, all three studied genera co-existed, while in Võrtsjärv, no toxic strains in genus *Dolichospermum* were found.

Significant values of *Mcy* gene copies were observed over the studied years. Earlier studies have shown a significant correlation between toxic genotypes and toxin concentrations. According to that, it can be assumed that significant concentrations of cyanotoxins could be found also in Lake Peipsi, in particular, during the accumulation of potentially toxic cyanobacterial biomass to the coastal areas. The abundance of toxin production genes in Peipsi Suurjärv was highest in 2011 and lowest in 2016. In Lämmijärv, highest in 2011 and 2014 and lowest in 2013. In Võrtsjärv the highest numbers of *Mcy* gene copies were found in 2014 and the lowest in 2016.

This study revealed that during the vegetation period, weather plays a major role in the total biomass of phytoplankton, including cyanobacteria. As a result, the abundance of toxic cyanobacteria is also influenced by the spring temperature rise and temperature drop in autumn. It is noted that cyanobacterial biomass peaks occur during the warmest periods. In this study, cyanobacteria were generally dominant during the warmest months of the vegetation period. In Lake Peipsi, the maximum number of toxic genotypes occurred in August and in Võrtsjärv in July, where the water temperatures exceeded 20 °C.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Berman, T.** (1972). Profiles of chlorophyll concentration by the in vivo fluorescence: some limnological applications. *Limnology and Oceanography*, 17, 616–618.
- Brodie, J., Lewis, J.** (eds). (2007). Unravelling the Algae. The past, present and future of algal systematics. *The Systematics Association. Special Volume*. CRC Press, Boca Raton, London, New York. 75
- Caldeira, K., & Wickett, M.** (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425(6956), 365–365.
- Canale, R.P., Vogel, A.H.** (1974). Effects of temperature on phytoplankton growth. *J. Environ. Eng. (American Society of Civil Engineers)*, 100, 229–241.
- Carmichael, W.** (1992). Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(6), 445–459.
- Carmichael, W.** (2001). Health effects of toxin producing cyanobacteria: the ‘CyanoHABS. *Hum Ecol Risk Assess* 7, 1393–1407.
- Carmichael, W., Mahmood, N.** (1984). Toxins from Freshwater Cyanobacteria. *ACS Symposium Series*, 377–389.
- Chorus, I., Bartram, J.** (1999). Toxic cyanobacteria in water. London: E & FN Spon.
- Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J., Bartram, J.J.** (2000). Health Risks Caused by Freshwater Cyanobacteria in Recreational Waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 3(4), 323–347.
- Chorus, I.** (ed.) (2001). Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences. Berlin: Springer-Verlag.
- Codd, G.A.** (1995). Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci Technol*, 32, 149–156.
- Codd, G., Bell, S., Kaya, K., Ward, C., Beattie, K., Metcalf, J.** (1999). Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal Of Phycology*, 34(4), 405–415.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J.** (2003). Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 13380–1338.
- Davis, T., Berry, D., Boyer, G., Gobler, C.** (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, 8(5), 715–725.
- De Senerpont Domis, L., Mooij, W., Huisman, J.** (2007). Climate-induced shifts in an experimental phytoplankton community: a mechanistic approach. *Hydrobiologia*, 584(1), 403–413.



- De Stasio, B., Hill, D., Kleinhans, J., Nibbelink, N., Magnuson, J.** (1996). Potential effects of global climate change on small north-temperate lakes: Physics, fish, and plankton. *Limnology And Oceanography*, 41(5), 1136-1149.
- Elliott, J., Jones, I., Thackeray, S.** (2006). Testing the Sensitivity of Phytoplankton Communities to Changes in Water Temperature and Nutrient Load, in a Temperate Lake. *Hydrobiologia*, 559(1), 401-411.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R.** (2005). Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(1), 43-50.
- Fogg, G.E.** (1969). The physiology of an algal nuisance. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 173, 175–189.
- Freitasa, E.C., Pinheirob, C., Rochaa, O., Loureirob, S.** (2014). Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton? The case study of *Daphnia magna* Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts. *Harmful Algae*, 31, 143–152.
- Gallon, J., Kittakoop, P., Brown, E.** (1994). Biosynthesis of anatoxin-a by *Anabaena flos-aquae*: Examination of primary enzymic steps. *Phytochemistry*, 35(5), 1195-1203.
- Garibyan, L., Avashia, N.** (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal Of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4.
- Gupta, N., Bhaskar, A., Rao, P.** (2002). Growth characteristics and toxin production in batch cultures of *Anabaena flos-aquae*: effects of culture media and duration. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 18(1), 29-35.
- Ha, J., Hidaka, T., Tsuno, H.** (2009). Quantification of Toxic *Microcystis* and Evaluation of Its Dominance Ratio in Blooms Using Real-Time PCR. *Environmental Science & Technology*, 43(3), 812-818.
- Haberman, J., Pihu, E., Raukas, A.** (2004). *Lake Võrtsjärv*. Tartu: Estonian Encyclopedia Publishers.
- Harada, K., Nakano, T., Fujii, K., Shirai, M.** (2004). Comprehensive analysis system using liquid chromatography–mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria. *Journal Of Chromatography A*, 1033(1), 107-113.
- Heid, C., Stevens, J., Livak, K., Williams, P.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
- Herrero, A., Flores, E.** (2008). *The cyanobacteria*. Norfolk, U.K.: Caister Academic Press.
- Holland, P., Abramson, R., Watson, R., Gelfand, D.** (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 88(16), 7276-7280.
- Huisman, J.M., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M.** (2005). *Harmful Cyanobacteria*. Springer Aquatic Ecology Series 3. Dordrecht, the Netherlands: Springer.

- Hudnell, K.H., Dortch, Q.** (2008). A synopsis of research needs identified at the interagency, International symposium on cyanobacterial harmful algal blooms (ISOC-HAB). In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs Series. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619, 950 pp.
- Ibelings, B., Chorus, I.** (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150(1), 177-192.
- International Agency for Research on Cancer (2010). Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. *World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, Lyon.
- ISO 10260. (1992). Water Quality: Measurement of biochemical parameter: Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentrations, *International Standards Organisation*, Geneva.
- Izaguirre, G., Taylor, W.D.** (2004). A guide to geosmin- and MIB-producing cyanobacteria in the United States. *Water Sci Technol*, 49, 19–24.
- Jöhnk, K., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P., Stroom, J.** (2008). Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology*, 14(3), 495-512.
- Karlson, B., Cusak, C., Bresnan, E.** (2010). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris: UNESCO.
- Kiviranta, J., Sivonen, K., Niemälä, S.I., Huovinen K.** (1991). Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(4), 423–436.
- Kós, P., Gorzó, G., Surányi, G., Borbély, G.** (1995). Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry*, 255(1), 49–53
- Kruskopf, M. and Flynn, K.J.** (2006). Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate. *The New Phytologist*, 169(3), 525–536.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Chorus, I.** (2003). The Abundance of Microcystin-Producing Genotypes Correlates Positively with Colony Size in *Microcystis* sp. and Determines Its Microcystin Net Production in Lake Wannsee. *Applied And Environmental Microbiology*, 69(2), 787-795.
- Laugaste, R., Nõges, T., Nõges, P., Yastremskij, V.V., Milius, A., Ott, I.** (2001). Algae. In: E. Pihu & J. Haberman (eds), *Lake Peipsi: Flora and Fauna*. Sulemees Publishers, Tartu: 31-49.
- Laugaste, R., Nõges, T., Tõnno, I.** (2008). Vetikad. In Peipsi (Haberman, J., Timm, T., Raukas, A., (eds), *Eesti Loodusfoto*, Tartu. 251-270.

- Laugaste, R., Panksep, K., Haldna, M.** (2013). Dominant cyanobacterial genera in Lake Peipsi (Estonia/Russia): effect of weather and nutrients in summer months. *Estonian Journal of Ecology*, 62(4), 229–243.
- Lawton, L.A., Edwards, E., Codd, G.A.** (1994). Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*, 119(7), 1525–1530.
- Litchman, E., Pinto, P.D., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., Yoshiyama, K.** (2010). Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia*, 653, 15–28.
- Loigu, E., Leisk, Ü., Iital, A., Pachel, K.** (2008). Peipsi järve valgala reostuskoormus ja jõgede veekvaliteet. In: J. Haberman, T. Timm, A. Raukas (eds), Peipsi. Eesti Loodusfoto, Tartu. 179–199.
- Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.** (2017). Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Metcalfe, J.S., Codd, G.A.** (2012). Cyanotoxins: In B.A. Whitton (ed.) The Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time, Second Edition, Springer, Dordrecht, 651–675.
- Metcalfe, J.S., Codd, G.A.** (2014). Cyanobacterial toxins (cyanotoxins) in water. *Found. Water Res.*, 1–47.
- Milius, A., Haldna, M.** (2008). Hüdrokeemia. In: J. Haberman, T. Timm, A. Raukas (eds), Peipsi. Eesti Loodusfoto, Tartu. 157–178.
- Neilan, B., Pearson, L., Muenchhoff, J., Moffitt, M., & Dittmann, E.** (2012). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1239–1253.
- Nõges, T., Nõges, P., Laugaste, R.** (2003). Water level as the mediator between climate change and phytoplankton composition in a large shallow temperate lake. *Hydrobiologia*, 506, 257–263.
- Nõges, T., Laugaste, R., Nõges, P., Tõnno, I.** (2008). Critical N:P ratio for cyanobacteria and N<sub>2</sub>-fixing species in large shallow temperate lakes Peipsi and Võrtsjärv, North-East Europe. *Hydrobiologia*, 599, 77–86.
- Orr, J., Fabry, V., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S., & Feely, R. et al.** (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437(7059), 681–686.
- Ostermaier, V., Kurmayer, R.** (2009) Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microbial Ecology*, 58 (2), 323–333.
- Paerl, H.W.** (1988). Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnol. Oceanogr.*, 33 (1988), 823–847.
- Paerl, H.W., Huisman, J.** (2008). Blooms like it hot. *Science*, 320, 57–58.

- Paerl, H.W., Hall, N.S., Calandrino, E.S.** (2011). Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci Tot Environ*, 409, 1739–1745.
- Paerl, H.W., Otten, T.G.** (2013). Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb Ecol*, 995-1010.
- Peeters, F., Straile, D., Lorke, A., Livingstone, D.** (2007). Earlier onset of the spring phytoplankton bloom in lakes of the temperate zone in a warmer climate. *Global Change Biology*, 13(9), 1898-1909.
- Peipsi järve hüdrobioloogiline seire ja uuringud. (2014). Uurnigu lõpparuanne. EMÜ põllumajandus- ja keskkonnainstituut.
- Peipsi järve hüdrobioloogiline seire ja uuringud. (2015). Uurnigu lõpparuanne. EMÜ põllumajandus- ja keskkonnainstituut. 17-31.
- Peipsi järve hüdrobioloogiline seire ja uuringud. (2017). Uurnigu lõpparuanne. EMÜ põllumajandus- ja keskkonnainstituut.
- Poon, G., Griggs, L., Edwards, C., Beattie, K., Codd, G.** (1993). Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry of cyanobacterial toxins. *Journal Of Chromatography A*, 628(2), 215-233.
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepisto, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., Sivonen, K.** (2006). Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Finnish Lakes with Genus-Specific Microcystin Synthetase Gene E (mcyE) PCR and Associations with Environmental Factors. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(9), 6101-6110.
- Rantala-Ylinen, A., Känä, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M., Sivonen, K.** (2011). Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 7271-7278.
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.** (1993). Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains — a laboratory study. *Journal Of Applied Phycology*, 5(6), 581-591.
- Rapala, J., Sivonen, K.** (1998). Assessment of Environmental Conditions That Favor Hepatotoxic and Neurotoxic *Anabaena* spp. Strains Cultured under Light Limitation at Different Temperatures. *Microbial Ecology*, 36(2), 181-192.
- Raukas, A., Pihu, E., Haberman, J.** (2003). Võrtsjärv. Eesti Entsüklopeediakirjastus,
- Reynolds, C.S., Walsby, A.E.** (1975). Waterblooms. *Biol. Rev*, 50, 437-481.
- Reynolds, C.S.** (1987). Cyanobacterial water blooms. *Adv. Bot. Res.*, 13, 67.

- Reynolds, C.S.** (1997). Successional development, energetics, and diversity in planktonic communities. T. Abe, S.A. Levin, M. Higashi (Eds.), *Biodiversity: An Ecological Perspective*, Springer. 247.
- Reynolds, C.S.** (2006). *Ecology of Phytoplankton (Ecology, biodiversity, and conservation)*. Cambridge University Press.
- Ritchie, R.J.** (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46 (1), 115–126.
- Robarts, R., Zohary, T.** (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand Journal Of Marine And Freshwater Research*, 21(3).
- Runnegar, M., Berndt, N., Kaplowitz, N.** (1995). Microcystin Uptake and Inhibition of Protein Phosphatases: Effects of Chemoprotectants and Self-Inhibition in Relation to Known Hepatic Transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134(2), 264-272.
- Sangolkar, L.N., Maske, S.S., Chakrabarti, T.** (2006). Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research*, 40(19), 3485–3496.
- Sartory, D.P., Grobbelaar, U.** (1984). Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*, 114, 177–187.
- Schantz, E.J., McFarren, E.F., Schafer, M.L., Lewis, K.H.** (1958). Purified shellfish poison for bioassay standardization. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 41, 160–168.
- Schopf, J.W.** (2000). The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In *The Ecology of Cyanobacteria*. Whitton, B.A., and Potts, M. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 13–35.
- Sipari, H., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Oksanen, I., Sivonen, K.** (2010). Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase E gene expression. *Applied and environmental microbiology*, 76, 3797–805.
- Sivonen, K.** (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate and bacteria on the growth of and hepa toxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol*, 56, 2658–2666.
- Sivonen, K., Jones, G.** (1999). Cyanobacterial toxins. In: *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (eds I. Chorus & J. Bartram). Published on behalf of the World Health Organization by E & FN Spon, London. 41-112.
- Sivonen, K.** (2009). Cyanobacterial Toxins. *Encyclopedia of Microbiology*. (eds.) Moselio Schaechter, Oxford: Elsevier, 290-307.

- Smith, J.L., Schulz, K.L., Zimba, P.V., Boyer, G.L.** (2010). Possible mechanism for the foodweb transfer of covalently bound microcystins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 757–761.
- Soares, R.M., Yuan, M., Servaites, J.C. et al.** (2006). Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Toxicology*, 21(2), 95–103.
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J.** (2003). Screening of cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass-spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020(1), 105–119.
- Stewart, I., & Falconer, I. R.** (2008). Cyanobacteria and cyanobacterial toxins. In W. P., Smith SL, Fleming LE, Solo-Gabriele HM, Grewick WH (Ed.), *Oceans and human health: risks and remedies from the seas*. United States: Academic Press 1st ed. 271–296.
- Suurnäkki, S., Panksep, K., Shams, S., Rantala-Ylinen, A., Salmaso, N., Sivonen, K.** Quantitative PCR detection of potential anatoxin-a producing cyanobacteria. Käsikiri.
- Svirčev, Z., Lujić, J., Marinović, Z. et al.** (2015). Toxicopathology induced by microcystins and nodularin: a histopathological review. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 33(2), 125–167.
- Tilman, D., Kiesling, R.L.** (1984). Freshwater algal ecology: taxonomic trade-offs in the temperature dependence of nutrient competitive abilities. M.J. Klug, C.A. Reddy (Eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*, American Society for Microbiology, Washington, DC. 314-319.
- Törökné, K.A.** (2000). The potential of the Thamnotoxkit microbiotest for routine detection of cyanobacterial toxins. In: *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, eds. G. Persoone, C. Janssen W. De Coen, Published Kluwer Academic/Plenum Publishers, 533–539.
- Utermöhl, H.** (1958). Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitteilung Internationale Vereinigung fuer Theoretische unde Amgewandte *Limnologie*, 9, 1–38.
- Uwins, H.K., Teasdale, P., Stratton, H.** (2007). A case study investigating the occurrence of geosmin and 2-methylisoborneol (MIB) in the surface waters of the Hinze Dam, Gold Coast, Australia. *Water Sci Technol*, 55, 231–238.
- Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Møkelke, L., Sivonen, K.** (2003). Quantitative Real-Time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7289-729.

- Vezie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K.** (2002). Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and non-toxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microb Ecol*, 43, 443–454.
- Võrtsjärve hüdrobioloogiline seire ja uuringud. (2015). Uurnigu lõpparuanne. EMÜ põllumajandus- ja keskkonnainstituut, 27-29.
- Walsby, A.** (1975). Gas Vesicles. *Annual Review Of Plant Physiology*, 26(1), 427-439.
- Walsby, A., Hayes, P., Boje, R., & Stal, L.** (1997). The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *New Phytologist*, 136(3), 407-417.
- Whitton, B., Potts, M.** (2004). The ecology of cyanobacteria. New York: Kluwer Academic.
- WHO. (1998). Guidelines for Drinking Water Quality: Recommendations, 2nd Edition, Addendum to Vol. 1. WHO, Geneva.
- Yilmaz, M., Ozic, C., Gok, I.** (2012). Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. In: Magdeldin, S. (editor) Gel Electrophoresis – Principles and Basics. *InTech*, 33–40.

**LISAD**



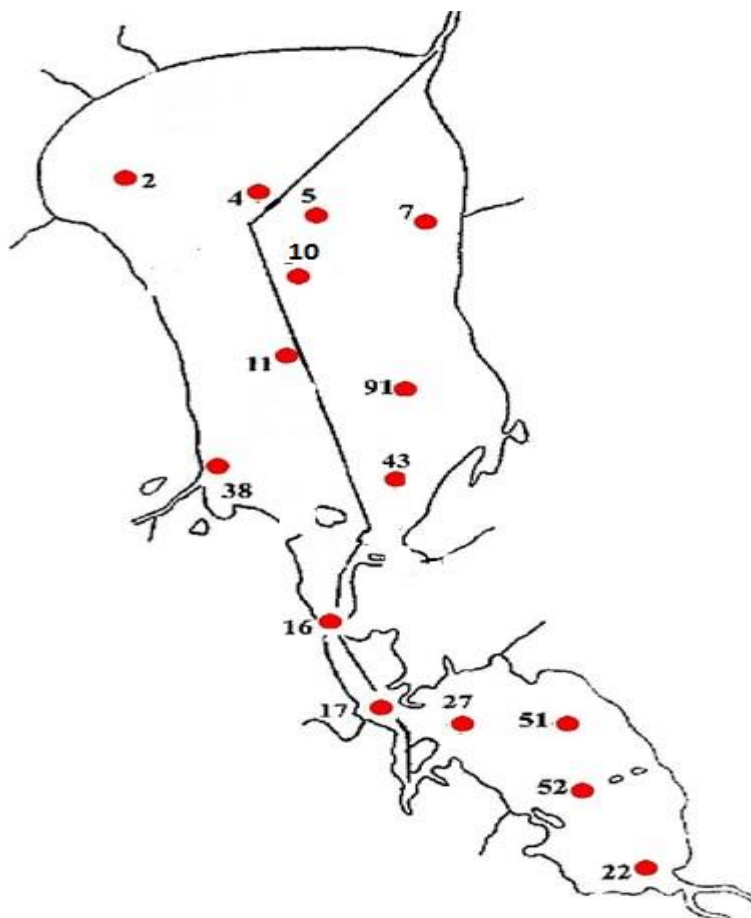
## LISA 1: VÕRTSJÄRVE SEIREPUNKTID



Seire igakuine proovipunkt:

Punkt	N	E
10	58°12'40"	26°06'20"

## LISA 2: PEIPSI JÄRVE SEIREPUNKTID



Vegetatsiooniperioodil igakuised  
seirepunktid:

Punkt	N	E
2	58°50'04"	27°06'25"
4	58°48'34"	27°22'18"
11	58°35'12"	27°26'12"
38	58°26'36"	27°16'36"
16	58°14'02"	27°29'12"
17	58°07'12"	27°34'30"

Augusti kuus toimuva ühisekspeditsiooni  
lisapunktid:

Punkt	N	E
5	58°47'17"	27°31'50"
7	58°46'20"	27°43'47"
10	58°43'57"	27°26'08"
91	58°35'02"	27°38'01"
43	58°25'33"	27°36'55"
51	58°05'21"	27°53'39"
27	58°05'39"	27°41'19"
52	57°59'21"	27°59'38"
22	57°54'39"	28°06'01"